

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
10 mai 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/36787 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 15/82

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03364

(22) Date de dépôt international :
30 octobre 2001 (30.10.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/13942 30 octobre 2000 (30.10.2000) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : AVEN-
TIS CROPS SCIENCE S.A. [FR/FR]; 55, avenue René
Cassin, F-69009 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : ZINK,
Olivier [FR/FR]; 1, place du Sausage, F-63000 Cler-
mont-Ferrand (FR). PAGET, Eric [FR/FR]; 123, avenue
du Général de Gaulle, F-69300 Caluire (FR). ROL-
LAND, Anne [FR/FR]; 41, rue Louis Bouquet, F-69009
Lyon (FR). SAILLAND, Alain [FR/FR]; 47 chemin
de Crécly, F-63370 Saint-Didier-au-Mont-d'Or (FR).
FREYSSINET, Georges [FR/FR]; 21, rue de Nerveux,
F-69450 Saint-Cyr-au-Mont-d'Or (FR).

(74) Mandataire : MONCONDUIT, Hervé; Aventis Crop-
Science S.A., 14-20, rue Pierre Baizet, B.P. 9163, F-69263
Lyon Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,

HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasi-
en (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

- relative au droit du déposant de demander et d'obtenir un
brevet (règle 4.17.ii)) pour les désignations suivantes AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE,
SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU,
ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasi- en (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: HERBICIDE-TOLERANT PLANTS THROUGH BYPASSING METABOLIC PATHWAY

(54) Titre : PLANTES TOLERANTES AUX HERBICIDES PAR CONTOURNEMENT DE VOIE METABOLIQUE

(57) Abstract: The invention concerns a novel method for making herbicide-tolerant plants, in particular to HPPD inhibiting her-
bicides, the nucleic acid sequences coding for enzymes capable of being used in said method, expression cassettes containing them
and transgenic plants comprising at least one of said expression cassettes.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une nouvelle méthode permettant de rendre les plantes tolérantes aux herbicides,
en particulier aux herbicides inhibiteurs d'HPPD, les séquences d'acides nucléiques codant pour des enzymes susceptibles d'être
employées dans cette méthode, les cassettes d'expression les contenant et les plantes transgéniques comprenant au moins l'une de
ces cassettes d'expression.

WO 02/36787 A2

Plantes tolérantes aux herbicides par contournement de voie métabolique

La présente invention concerne une nouvelle méthode permettant de rendre les plantes tolérantes aux herbicides, en particulier aux herbicides inhibiteurs d'HPPD, les séquences d'acide nucléique codant pour des enzymes susceptibles d'être employées dans cette méthode, les cassettes d'expression les contenant et les plantes transgéniques comprenant au moins l'une de ces cassettes d'expression.

Les hydroxy-phényl pyruvate dioxygénases sont des enzymes qui catalysent la réaction de transformation du para-hydroxy-phényl-pyruvate (HPP) en homogentisate. Cette réaction a lieu en présence de fer (Fe^{2+}) en présence d'oxygène (Crouch N.P. & al., Tetrahedron, 53, 20, 6993-7010, 1997).

On connaît par ailleurs certaines molécules inhibitrices de cette enzyme, qui viennent se fixer à l'enzyme pour inhiber la transformation de l'HPP en homogentisate. Certaines de ces molécules ont trouvé un emploi comme herbicides, dans la mesure où l'inhibition de la réaction dans les plantes conduit à un blanchiment des feuilles des plantes traitées, et à la mort des dites plantes (Pallett K. E. et al. 1997 Pestic. Sci. 50 83-84). De tels herbicides ayant pour cible l'HPPD décrits dans l'état de la technique sont notamment les isoxazoles (EP 418 175, EP 470 856, EP 487 352, EP 527 036, EP 560 482, EP 682 659, US 5 424 276) en particulier l'isoxaflutole, herbicide sélectif du maïs, les dicétonitriles (EP 496 630, EP 496 631), en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-2,3 Cl₂ phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones (EP 625 505, EP 625 508, US 5,506,195), en particulier la sulcotrione ou la mésotrione, ou encore les pyrazolines.

Des essais pour confirmer que l'HPPD est bien la cible des dicétonitriles (DKN) et pour mettre en évidence que l'HPPD est, au moins à certaines doses, la cible unique des dicétonitriles ont été effectués en laboratoire en faisant germer des graines d'*Arabidopsis* sur trois types de milieux en conditions stériles in-vitro :

- 1 milieu Murashig et Skoog(Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15, 473-479), expérience contrôle de la germination
- 2 milieu MS plus DKN à la dose de 1ppm
- 3 milieu MS plus DKN à la même dose + Homogentisate à la concentration de 5 mM.

Il est très net que sur le milieu 1 la germination se fait normalement, chaque

plantule développant deux cotylédons bien verts. Le développement se fait ensuite normalement. Sur le milieu 2, la germination a lieu mais la plantule qui émerge est blanche, les deux cotylédons ne présentant aucune pigmentation. Les plantules meurent ensuite en quelques jours. Sur le milieu 3, la germination se fait normalement, les 5 cotylédons sont bien verts. Les plantules se développent mais très rapidement, la quantité d'homogénisate dans le milieu diminuant, les premiers symptômes de blanchiment apparaissent et la croissance des plantes s'arrêtent, elles finissent par mourir comme dans l'essai effectué sur le milieu n°2.

Ceci permet de confirmer que l'HPPD est bien la cible des DKN in planta et 10 qu'elle semble être la cible unique. Ceci montre aussi que l'homogénisate est transporté du milieu de culture jusqu'au site cellulaire où il est nécessaire pour le bon fonctionnement de la cellule et la survie de la plante.

Pour rendre les plantes tolérantes aux herbicides, on dispose actuellement de trois stratégies, (1) la détoxification de l'herbicide par une enzyme venant transformer 15 l'herbicide, ou son métabolite actif, en produits de dégradation non toxique, comme par exemple les enzymes de tolérance au bromoxynil ou au basta (EP 242 236, EP 337 899) ; (2) la mutation de l'enzyme cible en une enzyme fonctionnelle moins sensible à l'herbicide, ou son métabolite actif, comme par exemple les enzymes de tolérance au glyphosate (EP 293 356, Padgett S. R. & al., J. Biol. Chem., 266, 33, 1991) ; ou (3) la 20 surexpression de l'enzyme sensible, de manière à produire dans la plante des quantités suffisantes d'enzyme cible au regard des constantes cinétiques de cette enzyme vis à vis de l'herbicide de manière à avoir suffisamment d'enzyme fonctionnelle, malgré la présence de son inhibiteur.

C'est cette troisième stratégie qui a été décrite pour obtenir avec succès des 25 plantes tolérantes aux inhibiteurs d'HPPD (WO 96/38567), étant entendu que pour la première fois une stratégie de simple surexpression de l'enzyme cible sensible (non mutée) était employée avec succès pour conférer aux plantes une tolérance à un niveau agronomique à un herbicide. L'identification d'HPPD mutées dans leur partie C-terminal présentant une tolérance améliorée aux inhibiteurs d'HPPD a permis d'obtenir 30 une amélioration de la tolérance des plantes par la mise en œuvre de la deuxième stratégie (WO 99/24585).

La présente invention consiste en une nouvelle méthode permettant de rendre les plantes tolérantes à un herbicide qui met en œuvre une nouvelle ou quatrième stratégie

de tolérance herbicide, cette nouvelle stratégie comprenant le contournement de la voie métabolique inhibée par ledit herbicide. Ce contournement métabolique peut se résumer comme suit :

- soit un herbicide « H » actif en inhibant l'activité d'une enzyme « E » qui transforme le substrat « S » en produit « P », ledit produit P et ses métabolites étant essentiels à la vie de la plante,
- le contournement métabolique consiste à exprimer dans la plante au moins une nouvelle enzyme « NE » hétérologue insensible à « H » permettant la conversion de « S » en un produit intermédiaire « I », lequel est ensuite transformé en « P » soit pas les voies de biosynthèse naturelles de la plante soit par l'expression d'au moins une autre enzyme hétérologue « AE » également insensible à « H »,
- le contournement métabolique consistant également à exprimer au moins une autre enzyme hétérologue « AE » insensible à « H » permettant la conversion de « I » en « P », « I » étant soit un intermédiaire naturellement produit par la plante soit obtenu par l'expression d'au moins une nouvelle enzyme hétérologue « NE » insensible à « H » permettant la conversion de « S » en « I ».

La présente invention concerne plus particulièrement une nouvelle méthode permettant de rendre les plantes tolérantes aux inhibiteurs d'HPPD, ladite méthode comprenant le contournement métabolique de l'HPPD.

Aucune voie de contournement métabolique n'a été décrite à ce jour dans les plantes.

On connaît de la littérature que la conversion de l'HPP en homogénisate peut être obtenue en effectuant d'abord une conversion de l'HPP en acide 4-hydroxyphénylacétique (4-HPA) par un extrait enzymatique présentant une activité HPP oxydase suivie de la conversion du 4-HPA en homogénisate par un extrait enzymatique présentant une activité 4-HPA 1-hydrolase (WO 99/34008). Cette voie de contournement est représentée par la Figure 1.

Une étude bibliographique révèle que les activités enzymatiques nécessaires pour la construction de la voie de contournement de l'HPPD ont été caractérisées sur des extraits bruts bactériens dans les années 1970. Ainsi, les activités HPP oxydase (HPPO, E.C. 1.2.3.-) et 4-HPA 1-hydroxylase (HPAH, E.C. 1.14.13.18.) ont été identifiées respectivement chez *Arthrobacter globiformis* (Blakley, 1977) et chez *Pseudomonas acidovorans* (Hareland *et al.*, 1975). Depuis lors, seule la HPAH a été purifiée par

Suemori *et al.* (1996); cependant, ni la séquence protéique ni la séquence nucléique ne sont publiées. Il faut donc identifier les gènes codant ces activités enzymatiques.

Dans la voie de contournement, la conversion de l'HPP en HGA se fait *via* le 4-HPA. Or, le 4-HPA est un composé rarement identifié chez les plantes. Il est présent chez l'*Astilbe chinensis* (Kindl, 1969), dans les *Plantago* sp. (Swiatek, 1977), dans le pissenlit (*Taraxacum officinale*; Dey & Harborne, 1997), chez les *Artemisia* (Swiatek *et al.*, 1998), dans le fruit du *Forsythia suspensa* (Liu *et al.*, 1998) et enfin chez l'algue marine *Ulva lactuca* (Flodin *et al.*, 1999). Il y a peu de données sur son origine. Il semble pouvoir provenir de la tyrosine, du shikimate, de la tyramine. Il n'y a pas davantage d'information sur son devenir et son rôle dans la plante. Kindl (1969) a montré sa dégradation *via* l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique tandis que Flodin *et al.* (1999) ont démontré sa conversion *via* l'acide 4-hydroxymandélique en 2,4,6-tribromophénol qui s'accumule dans l'algue verte *Ulva lactuca*. Gross (1975) suggère que le 4-HPA pourrait être un régulateur de croissance chez certaines plantes supérieures et Abe *et al.* (1974) le considèrent comme un analogue d'auxine chez les algues.

Pour mettre en œuvre la voie de contournement métabolique de l'HPPD il aura fallu au préalable identifier et isoler les gènes et les séquences d'acide nucléique codant pour la ou les enzymes responsables des deux activités ci-dessus.

20 Définitions selon l'invention

« Séquence d'acide nucléique » : une séquence nucléotidique ou polynucléotide, pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN, notamment double brin. La séquence d'acide nucléique peut être d'origine naturelle, en particulier ADN génomique ou ADNc, ou encore une séquence synthétique ou semi-synthétique, les acides nucléiques la comprenant ayant été choisis soit pour optimiser les codons d'une séquence codante en fonction de l'organisme hôte dans lequel elle sera exprimée, soit pour introduire ou éliminer un ou plusieurs sites de restriction. Les méthodes de préparation des séquences d'acide nucléique synthétiques ou semi-synthétiques sont bien connues de l'homme du métier.

30 « Séquence capable de s'hybrider de manière sélective » : les séquences d'acide nucléique qui s'hybrident avec une séquence d'acide nucléique de référence à un niveau supérieur au bruit de fond de manière significative. Le bruit de fond peut être lié à l'hybridation d'autres séquences d'ADN présentes, notamment d'autres ADNc

présentes dans une banque d'ADNc. Le niveau du signal généré par l'interaction entre la séquence capable de s'hybrider de manière sélective et les séquences définies par les séquence ID ci-dessus selon l'invention est généralement 10 fois, de préférence 100 fois plus intense que celui de l'interaction des autres séquences d'ADN générant le bruit de fond. Le niveau d'interaction peut être mesuré par exemple, par marquage de la sonde avec des éléments radioactifs, comme le ^{32}P . L'hybridation sélective est généralement obtenue en employant des conditions de milieu très sévères (par exemple NaCl 0,03 M et citrate de sodium 0,03 M à environ 50°C-60°C). L'hybridation peut bien entendu être effectuée selon les méthodes usuelles de l'état de la technique (notamment Sambrook & al., 1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual).

« Homologue d'une séquence d'acide nucléique » : séquence d'acide nucléique présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport à une séquence d'acide nucléique de référence. Ces modifications peuvent être obtenues selon les techniques usuelles de mutation, ou encore en choisissant les oligonucléotides synthétiques employés dans la préparation de ladite séquence par hybridation. Au regard des multiples combinaisons d'acides nucléiques pouvant conduire à l'expression d'un même acide aminé, les différences entre la séquence de référence selon l'invention et l'homologue correspondant peuvent être importantes. De manière avantageuse, le degré d'homologie sera d'au moins 60 % par rapport à la séquence de référence, de préférence d'au moins 70 %, plus préférentiellement d'au moins 80%, encore plus préférentiellement d'au moins 90 %. Ces modifications sont généralement et de préférence neutres, c'est à dire que pour une séquence codante elles n'affectent pas la séquence primaire de la protéine ou du peptide codé. Elles peuvent toutefois introduire des modifications non silencieuses, ou mutations, qui n'affectent pas la fonction de la séquence d'acide nucléique par rapport à la séquence de référence. Les méthodes de mesure et d'identification des homologies entre les séquences d'acides nucléiques sont bien connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple les programmes PILEUP ou BLAST (notamment Altschul & al., 1993, J. Mol. Evol. 36 :290-300 ; Altschul & al., 1990, J. Mol. Biol. 215 :403-10).

« Fragments » : fragment d'une séquence d'acide nucléique ou polypeptidique de référence pour laquelle des parties ont été déléetées mais qui conservent la fonction de ladite séquence de référence.

« Hétérologue » : séquence d'acide nucléique différente de la séquence d'acide

nucléique ayant la même fonction dans un organisme naturel. Une séquence hétérologue peut consister en une séquence d'acide nucléique modifiée *in situ* dans son environnement naturel. Il peut également s'agir d'une séquence d'acide nucléique isolée de son organisme naturel puis réintroduite dans ce même organisme. Il peut également 5 s'agir d'une séquence d'acide nucléique hétérologue par rapport à une autre séquence d'acide nucléique, c'est à dire une séquence associée à une autre séquence, cette association ne se trouvant pas dans la nature. C'est le cas notamment des cassettes d'expression constituées de différentes séquences d'acide nucléique ne se trouvant pas généralement associées dans la nature.

10 « Homologue d'une séquence protéique » : séquences protéiques dont la séquence primaire est différente de la séquence primaire de la protéine de référence, mais qui remplit la même fonction que cette séquence de référence. Les méthodes de mesure et d'identification des homologues entre polypeptides ou protéines sont également connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple le « package » UWGCG et le 15 programme BESTFIT pour calculer les homologues (Devèrux & al., 1984, Nucleic Acid Res. 12, 387-395).

« Cassette d'expression » : séquence d'acide nucléique comprenant différents éléments fonctionnels nécessaires à l'expression d'une séquence codante dans un organisme hôte. Ces éléments fonctionnels comprennent dans le sens de la transcription 20 une séquence de régulation promotrice, également appelée promoteur, liée de manière fonctionnelle à une séquence codante et une séquence de régulation terminatrice, également appelée terminateur ou stop. La cassette d'expression peut également comprendre entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante des éléments de régulations tels que des activateurs de transcription ou « enhancers » et/ou 25 des introns.

« Organisme hôte » : on entend essentiellement selon l'invention les cellules végétales ou les plantes. Pour les vecteurs de clonages, les organismes hôtes peuvent également être des bactéries, des champignons ou des levures.

« Cellule végétale » : cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus 30 indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

« Plante » : organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédone ou dicotylédone, plus particulièrement des plantes de

culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le riz, le maïs, le blé, l'orge, la canne à sucre, le colza, le soja, la betterave, la pomme de terre, le tabac, le coton, le trèfle, le gazon, ou les plantes ornementales comme les pétunias, ou encore les bananiers, la vigne, les framboises, les fraises, les tomates, les salades, etc.

- 5 « Séquence de régulation promotrice » : Comme séquence de régulation promotrice dans les plantes, on peut utiliser toute séquence de régulation promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur s'exprimant notamment dans les feuilles des plantes, comme par exemple des promoteurs dits constitutifs d'origine bactérienne, virale ou végétale ou encore des promoteurs dits
- 10 lumière dépendants comme celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO) de plante ou tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. Parmi les promoteurs d'origine végétale on citera les promoteurs d'histone tels que décrits dans la demande EP 0 507 698, ou le promoteur d'actine de riz (US 5,641,876). Parmi les promoteurs d'un gène de virus de plante, on citera celui de la
- 15 mosaïque du chou fleur (CAMV 19S ou 35S), du CsVMV (US ...) ou le promoteur du circovirus (AU 689 311). On peut encore utiliser une séquence de régulation promotrice spécifique de régions ou de tissus particuliers des plantes, et plus particulièrement des promoteurs spécifiques des graines ([22] Datla, R. & al., Biotechnology Ann. Rev. (1997) 3, 269-296), notamment les promoteurs de la napine (EP 255 378), de la
- 20 phaseoline, de la glutenine, de l'héliantinine (WO 92/17580), de l'albumine (WO 98/45460), de l'oélosine (WO 98/45461), de l'ATS1 ou de l'ATS3 (PCT/US98/06978, déposée le 20 octobre 1998, incorporée ici par référence). On peut également employer un promoteur inductible avantageusement choisi parmi les promoteurs de phénylalanine
- 25 d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB (US 5 670 349, Tableau 3), le promoteur HMG2 (US 5 670 349), le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou le promoteur de l'acide cyclopropane carboxylate synthase (ACC synthase) de pomme (WO 98/45445).

- « Activateurs de transcription ("enhancer") » : on citera par exemple l'activateur de
- 30 transcription du virus de la mosaïque du tabac (VMT) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (VET) décrit par Carrington & Freed.

« Introns » : séquences d'acide nucléique non traduites. On citera par exemple l'intron 1 du gène d'histone d'*Arabidopsis* tel que décrit dans la demande de brevet

WO 97/04114 pour une expression dans les plantes dicotylédones, le premier intron de l'actine de riz décrit dans la demande de brevet WO 99/34005, ou l'intron adh1 de maïs pour une expression dans les plantes monocotylédones.

« Séquence codante » : séquence d'acide nucléique traduite. Elle comprend une séquence codant pour une protéine ou un peptide d'intérêt, éventuellement fusionnée en 5' ou en 3' avec une séquence codant pour un peptide signal ou d'adressage vers un compartiment cellulaire particulier.

« Peptide signal ou d'adressage » : peptides fusionnés à une protéine ou à un peptide d'intérêt dans leur partie N- ou C-terminale, reconnus par la machinerie cellulaire permettant l'adressage de la protéine ou du peptide d'intérêt vers un compartiment cellulaire particulier. Il s'agit en particulier de peptides de transit chloroplastiques permettant l'adressage de la protéine ou du peptide d'intérêt dans les chloroplastes, ou de peptides signaux vers divers compartiments cellulaires, par exemple la vacuole, les mitochondries, le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi, etc. Le rôle de telles séquences protéiques sont notamment décrites dans le numéro 38 de la revue Plant molecular Biology (1998) consacré en grande partie aux transports des protéines dans les différents compartiments de la cellule végétale (Sorting of proteins to vacuoles in plant cells pp 127-144 ; the nuclear pore complex pp 145-162 ; protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes pp 91-207 ; multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts pp 209-221 ; mitochondrial protein import in plants pp 311-338).

« Peptide de transit chloroplastique » : le peptide de transit chloroplastique est codé par une séquence d'acide nucléique en 5' de la séquence d'acide nucléique codant pour une protéine ou un peptide d'intérêt, de manière à permettre l'expression d'une protéine de fusion peptide de transit/protéine (peptide) d'intérêt. Le peptide de transit permet d'adresser la protéine ou le peptide d'intérêt dans les plastes, plus particulièrement les chloroplastes, la protéine de fusion étant clivée entre le peptide de transit et la protéine ou le peptide d'intérêt au passage de la membrane des plastes. Le peptide de transit peut être simple, comme un peptide de transit d'EPSPS (US 5,188,642) ou un peptide de transit de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (ssu RuBisCO) d'une plante, éventuellement comprenant quelques acides aminés de la partie N-terminale de la ssu RuBisCO mature (EP 189 707) ou encore un peptide de transit multiple comprenant un premier peptide de transit de plante fusionné à une partie de la

séquence N-terminale d'une protéine mature à localisation plastidiale, fusionnée à un deuxième peptide de transit de plante tel que décrit dans le brevet EP 508 909, et plus particulièrement le peptide de transit optimisé comprenant un peptide de transit de la ssu RuBisCO de tournesol fusionné à 22 acides aminés de l'extrémité N-terminale de la ssu RuBisCO de maïs fusionnée au peptide de transit de la ssu RuBisCO de maïs tel que décrit avec sa séquence codante dans le brevet EP 508 909.

« Peptide signal » : ces séquences peptidiques sont notamment décrites dans le numéro 38 de la revue Plant molecular Biology (1998) consacré en grande partie aux transports des protéines dans les différents compartiments de la cellule végétale (Sorting of proteins to vacuoles in plant cells pp 127-144 ; the nuclear pore complex pp145-162 ; protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes pp 91-207 ; multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts pp 209-221 ; mitochondrial protein import in plants pp 311-338). Des peptides d'adressage vers la vacuole sont largement décrits dans la littérature (Neuhaus J.M. and Rogers J.C Sorting of proteins to vacuoles in plant cells Plant molecular Biology 38 : 127-144, 1998). De préférence, le peptide vacuolaire est le peptide vacuolaire de la protéine décrite dans J.M. Ferullo et al (Plant Molecular Biology 33 : 625-633, 1997), fusionné à la partie C-terminale de la protéine ou du peptide d'intérêt.

« Séquence de régulation terminatrice » : comprenant également les séquences de polyadénylation, on entend toute séquence fonctionnelle dans les cellules végétales ou les plantes qu'elles soient d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, d'origine virale, comme par exemple le terminateur du CaMV 35S, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

« Vecteur » : vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte contenant au moins une cassette d'expression. Le vecteur comprend outre la cassette d'expression, au moins une origine de répllication. Le vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction de la cassette d'expression. De tels vecteurs de transformation en fonction de l'organisme hôte à transformer sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature. Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de répllication et d'expression.

De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes est un plasmide.

HPP Oxydase

Un premier objet de l'invention concerne une séquence d'acide nucléique codant pour une HPP Oxydase, et le polypeptide correspondant. De manière préférentielle, l'HPP oxydase est insensible aux inhibiteurs d'HPPD, en particulier aux isoxazoles comme l'isoxaflutole et leurs dikétonitriles, notamment ceux définis précédemment. L'HPP oxydase est notamment une HPP oxydase d'origine bactérienne, par exemple d'*Arthrobacter*, en particulier d'*Arthrobacter globiformis*. L'HPP oxydase est avantagusement une protéine dont la séquence primaire d'acides aminés est représentée par l'identificateur de séquence n°2 (SEQ ID NO 2) ses séquences homologues et ses fragments.

Des séquences protéiques d'HPP oxydases homologues de la SEQ ID NO 2 sont notamment représentées par les SEQ ID NO 4 et 6, ses séquences homologues et ses fragments.

L'HPP oxydase représentée par la SEQ ID NO 4 correspond à l'HPP oxydase de la SEQ ID NO 2 pour laquelle une Glycine est remplacée par une Alanine.

La présente invention concerne également une séquence d'acide nucléique codant pour une HPP oxydase telle que définie ci-dessus.

De manière préférentielle, la séquence codant pour l'HPP oxydase est une séquence d'ADN, notamment ADN génomique ou ADN-c, en particulier une séquence hétérologue ou isolée.

La séquence codant pour une HPP oxydase selon l'invention est notamment choisie parmi les séquences codantes des séquences d'ADN représentées par les SEQ ID NO 1, 3, 5 ou 15, leurs séquences homologues, leurs fragments et les séquences capable de s'hybrider de manière sélective aux SEQ ID 1, 3, 5 ou 15.

La séquence codante de la SEQ ID NO 5 comprend trois mutations en positions 463, 602 et 1511 par rapport à la SEQ ID NO 1 qui sont silencieuses, c'est à dire n'introduisant aucune modification du polypeptide correspondant.

4-HPA 1-hydroxylase

Un deuxième objet de l'invention concerne les moyens nécessaires à l'expression de la 4-HPA 1-hydroxylase. Contrairement à ce qui était attendu de la littérature sur l'activité de certains extraits protéiques, il a été constaté que l'activité 4-HPA 1-

hydroxylase dans les bactéries, en particulier *Pseudomonas*, résultait de la somme de l'activité de deux enzymes dénommées ci-après HPAH et HPAC.

HPAH

L'HPAH permet la conversion de l'HPA en métabolite intermédiaire dénommé ci-après métabolite Z dont la structure reste indéterminée. Il peut être envisagé sérieusement que l'HPAH permet l'hydroxylation du noyau aromatique de l'HPA, le métabolite Z se stabilisant sous forme d'une cétoné. Cette hypothèse d'activité enzymatique est représentée sur la figure 2.

Un deuxième objet de l'invention concerne donc une séquence d'acide nucléique codant pour une HPAH, et le polypeptide correspondant. De manière préférentielle, l'HPAH est insensible aux inhibiteurs d'HPPD, en particulier aux isoxazoles comme l'isoxaflutole et leurs dikétonitriles, notamment ceux définis précédemment. L'HPAH est notamment une HPAH d'origine bactérienne, par exemple de *Pseudomonas*, en particulier de *Pseudomonas acidovorans*. L'HPAH est avantageusement une protéine dont la séquence primaire d'acides aminés est représentée par les identificateurs de séquence n°8 et 18 (SEQ ID NO 8 et SEQ ID NO 18) leurs séquences homologues et leurs fragments.

La présente invention concerne également une séquence d'acide nucléique codant pour une HPAH telle que définie ci-dessus.

De manière préférentielle, la séquence codant pour l'HPAH est une séquence d'ADN, notamment ADN génomique ou ADN-c, en particulier une séquence hétérologue ou isolée.

La séquence codant pour une HPAH selon l'invention est notamment choisie parmi les parties codantes des séquences représentées par les SEQ ID NO 7 ou 17, leurs séquences homologues, leurs fragments et les séquences capable de s'hybrider de manière sélective aux SEQ ID NO 7 ou 17.

HPAC

L'HPAC est la deuxième enzyme permettant la conversion du métabolite Z en en homogentisate.

Un troisième objet de l'invention concerne donc une séquence d'acide nucléique codant pour une HPAC, et le polypeptide correspondant. De manière préférentielle, l'HPAC est insensible aux inhibiteurs d'HPPD, en particulier aux isoxazoles comme l'isoxaflutole et leurs dikétonitriles, notamment ceux définis précédemment. L'HPAH

est notamment une HPAC d'origine bactérienne, par exemple de *Pseudomonas*, en particulier de *Pseudomonas acidovorans*. L'HPAH est avantageusement une protéine dont la séquence primaire d'acides aminés est représentée par l'identificateur de séquence n°10 (SEQ ID NO 10) ses séquences homologues et ses fragments.

- 5 Des séquences protéiques d'HPAC homologues de la SEQ ID NO 10 sont notamment représentées par les SEQ ID NO 12, 14 et 20, leurs séquences homologues et leurs fragments.

La présente invention concerne également une séquence d'acide nucléique codant pour une HPAC telle que définie ci-dessus.

- 10 De manière préférentielle, la séquence codant pour l'HPAC est une séquence d'ADN, notamment ADN génomique ou ADN-c, en particulier une séquence hétérologue ou isolée.

- La séquence codant pour une HPAC selon l'invention est notamment choisie parmi les parties codantes des séquences représentées par les SEQ ID NO 9, 11, 13 ou 19, 15 leurs séquences homologues, leurs fragments et les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux SEQ ID NO 9, 11, 13 ou 19.

Cassettes d'expression

- La présente invention concerne également une cassette d'expression dont la séquence codante comprend une séquence d'acide nucléique sélectionnée parmi les 20 séquences d'acide nucléique codant pour une HGA oxydase, une HGAH ou HGAC telles que définies ci-dessus.

- La séquence codante peut également comprendre en 5' ou en 3' une séquence codant pour un peptide signal ou un peptide de transit. De manière avantageuse, la séquence codante comprend en 5' de la séquence codant pour HGA oxydase, une HGAH ou une 25 HGAC, une séquence codant pour un peptide de transit d'adressage chloroplastique, en particulier un peptide de transit multiple, plus particulièrement le peptide de transit optimisé.

- La présente invention concerne donc également une protéine de fusion peptide de transit/HGA oxydase, peptide de transit/HGAH ou peptide de transit/HGAC, la séquence 30 du peptide de transit étant définie précédemment, en particulier la séquence du peptide de transit optimisé tel que décrit dans la demande de brevet EP 508 909.

De manière préférentielle, la séquence de régulation promotrice est choisie parmi les séquences de régulation promotrice permettant une expression constitutive de la

séquence codante. Il s'agira en particulier des séquences des promoteurs du CaMV 35S, du CsVMV, de l'actine de riz ou d'histone.

On peut également choisir d'exprimer les séquences codantes selon l'invention à un niveau d'expression voisin du niveau d'expression du gène que l'on cherche à contourner. On pourra employer dans la cassette d'expression selon l'invention une séquence de régulation promotrice choisie parmi les séquences de régulation promotrices d'HPPD de plantes.

Pour l'expression des trois enzymes HPP oxydase, HGAH et HGAC dans une même plante, on pourra choisir les cassettes d'expression des séquences codantes correspondantes, des séquences de régulation promotrices différentes présentant des profils d'expression différents, par leur force et/ou leur localisation dans les différents organes fonctionnels de la plante.

On pourra choisir des séquences de régulation promotrice permettant un gradient d'expression HGAC>HGAH>HPP oxydase ou inversement.

Pour l'expression de l'HPP oxydase, de l'HGAH et de l'HGAC, la séquence de régulation promotrice est avantageusement choisie parmi le groupe comprenant les promoteurs d'HPPD de plante, d'histone H3 ou H4, notamment d'*Arabidopsis* ou de maïs, en particulier ceux décrits dans la demande de brevet EP 507 698, de SSU de RuBisCO de plante, en particulier de tournesol ou de maïs comme décrit dans la demande de brevet WO 99/25842, du CaMV 35S ou du CsVMV, et leurs combinaisons, en particulier les promoteurs hybrides histone/35S tels que décrits dans les exemples de la demande de brevet EP 507 698. Pour une expression dans les plantes monocotylédones, ces séquences de régulation promotrices seront avantageusement associées avec le premier intron de l'actine de riz.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la cassette d'expression codant pour une HPP oxydase comprend un promoteur d'histone, une séquence codant pour une HPP oxydase et un terminateur d'histone (Figure 12 ; SEQ ID NO 15).

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cassette d'expression codant pour une HPAH comprend un promoteur CaMV 35S, une séquence codant pour une HPAH et un terminateur NOS (Figure 11 ; SEQ ID NO 17).

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cassette d'expression codant pour une HPAC comprend un promoteur CsVMV, une séquence codant pour une HPAC et un terminateur NOS (Figure 10 ; SEQ ID NO 19).

Vecteurs :

La présente invention concerne également un vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant au moins une cassette d'expression selon l'invention.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, le vecteur comprend une seule
5 des cassettes d'expression selon l'invention choisie parmi les cassettes comprenant une séquence codante pour une HPP oxydase, une HGAH ou HGAC telles que définies précédemment.

Selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, le vecteur comprend deux cassettes d'expression selon l'invention choisies parmi les cassettes comprenant une
10 séquence codante pour une HPP oxydase, une HGAH ou HGAC telles que définies précédemment associées deux à deux dans un même vecteur : HPP oxydase et HGAH, HPP oxydase et HGAC, HGAH et HGAC.

Un vecteur comprenant une cassette d'expression codant pour l'HPAH et une autre codant pour l'HPAC peut comprendre la combinaison des deux cassettes d'expression
15 définies précédemment (SEQ ID NO 17 et 19). Une telle cassette d'expression est représentée par la Figure 13 et la SEQ ID NO 21.

Selon un troisième mode de réalisation de l'invention, le vecteur comprend trois cassettes d'expression selon l'invention, une première cassette d'expression de l'HPP oxydase, une deuxième cassette d'expression de l'HGAH et une troisième cassette
20 d'expression de l'HGAC. Une telle cassette d'expression peut comprendre la combinaison des trois cassettes définies précédemment (SEQ ID NO 15, 17 et 19). Un tel vecteur est représentée sur la figure 14 et la SEQ ID NO 22.

Les vecteurs selon l'invention tels que définis ci-dessus peuvent également comprendre des cassettes d'expression d'autres protéines ou peptides d'intérêt.

25 Lorsque le vecteur comprend plusieurs cassettes d'expression, ces dernières peuvent prendre différentes orientations deux à deux l'une par rapport à l'autre, colinéaires, divergentes ou convergentes.

Les cassettes d'expression d'autres protéines ou peptides d'intérêt comprennent une séquence d'acide nucléique codant pour des protéines ou peptides d'intérêt différents de
30 l'HPP oxydase, de l'HGAH et de l'HGAC définis ci-dessus.

Il peut s'agir de séquences d'un gène codant pour un marqueur de sélection comme d'un gène conférant à la plante transformée de nouvelles propriétés agronomiques, ou d'un gène d'amélioration de la qualité agronomique de la plante transformée.

Marqueurs de Sélection

Parmi les gènes codant pour des marqueurs de sélection, on peut citer les gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes de tolérance aux herbicides (bialaphos, glyphosate ou isoxazoles), des gènes codant pour des enzymes rapporteurs facilement
5 identifiables comme l'enzyme GUS, des gènes codant pour des pigments ou des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. De tels gènes marqueurs de sélection sont notamment décrits dans les demandes de brevet EP 242 236, EP 242 246, GB 2 197 653, WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

10 Gènes d'intérêt

Parmi les gènes conférant de nouvelles propriétés agronomiques aux plantes transformées, on peut citer les gènes conférant une tolérance à certains herbicides, ceux conférant une résistance à certains insectes, ceux conférant une tolérance à certaines maladies, etc. De tels gènes sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO
15 91/02071 et WO 95/06128.

Tolérance herbicide

La présente invention est particulièrement appropriée pour l'expression de gènes conférant une tolérance à certains herbicides aux cellules végétales et aux plantes monocotylédones transformées. Parmi les gènes conférant une tolérance à certains
20 herbicides, on peut citer le gène Bar conférant une tolérance au bialaphos, le gène codant pour une EPSPS appropriée conférant une résistance aux herbicides ayant l'EPSPS comme cible comme le glyphosate et ses sels (US 4,535,060, US 4,769,061, US 5,094,945, US 4,940,835, US 5,188,642, US 4,971,908, US 5,145,783, US 5,310,667, US 5,312,910, US 5,627,061, US 5,633,435, FR 2 736 926), le gène codant
25 pour la glyphosate oxydoréductase (US 5,463,175), ou encore un gène codant pour une HPPD conférant une tolérance aux herbicides ayant pour cible l'HPPD comme les isoxazoles, notamment l'isoxafutole (FR 95 06800, FR 95 13570), les dicétonitriles (EP 496 630, EP 496 631) ou les tricétones, notamment la sulcotrione (EP 625 505, EP 625 508, US 5,506,195). De tels gènes codant pour une HPPD conférant une tolérance aux
30 herbicides ayant pour cible l'HPPD sont décrits dans la demande de brevet WO 96/38567.

Parmi les gènes codant pour une EPSPS appropriée conférant une résistance aux herbicides ayant l'EPSPS comme cible, on citera plus particulièrement le gène codant

pour une EPSPS végétale, en particulier de maïs, présentant deux mutations 102 et 106, décrit dans la demande de brevet FR 2 736 926, dénommé ci-dessous EPSPS double mutant, ou encore le gène codant pour une EPSPS isolée d'*Agrobacterium* décrit par les séquences ID 2 et ID 3 du brevet US 5,633,435, dénommé ci-dessous CP4.

5 Parmi les gènes codant pour une HPPD conférant une tolérance aux herbicides ayant pour cible l'HPPD, on citera plus particulièrement l'HPPD de *Pseudomonas* et celle d'*Arabidopsis*, décrites dans la demande de brevet WO 96/38567.

Dans les cas des gènes codant pour EPSPS ou HPPD, et plus particulièrement pour les gènes ci-dessus, la séquence codant pour ces enzymes est avantageusement
10 précédée par une séquence codant pour un peptide de transit, en particulier pour le peptide de transit dit peptide de transit optimisé décrit dans les brevets US 5,510,471 ou US 5,633,448.

Résistance aux Insectes

Parmi les protéines d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux
15 insectes, on citera plus particulièrement les protéines *Bt* largement décrites dans la littérature et bien connues de l'homme du métier. On citera aussi les protéines extraites de bactéries comme *Photobacterium* (WO 97/17432 & WO 98/08932).

Résistance aux Maladies

Parmi les protéines ou peptides d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de
20 résistance aux maladies on citera notamment les chitinases, les glucanases, l'oxalate oxydase, toutes ces protéines et leurs séquences codantes étant largement décrites dans la littérature, ou encore les peptides antibactériens et/ou antifongiques, en particulier les peptides de moins de 100 acides aminés riches en cystéines comme les thionines ou défensines de plantes, et plus particulièrement les peptides lytiques de toutes origines
25 comprenant un ou plusieurs ponts disulfures entre les cystéines et des régions comprenant des acides aminés basiques, notamment les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine ou peptide
30 d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines (Kamoun & al., 1993 ; Panabières & al., 1995).

Modification de la qualité

On peut également citer les gènes modifiant la constitution des plantes modifiées, en

particulier la teneur et la qualité de certains acides gras essentiels (EP 666 918) ou encore la teneur et la qualité des protéines, en particuliers dans les feuilles et/ou les graines desdites plantes. On citera en particulier les gènes codant pour des protéines enrichies en acides aminés soufrés (Korit, A.A. & al., Eur. J. Biochem. (1991) 195, 329-334 ; WO 98/20133 ; WO 97/41239 ; WO 95/31554 ; WO 94/20828 ; WO 92/14822).

Ces protéines enrichies en acides aminés soufrés auront également pour fonction de piéger et stocker la cystéine et/ou la méthionine excédentaire, permettant d'éviter les problèmes éventuels de toxicité liés à une surproduction de ces acides aminés soufrés en les piégeant. On peut citer également des gènes codant pour des peptides riches en acides aminés soufrés et plus particulièrement en cystéines, les dits peptides ayant également une activité antibactérienne et/ou antifongique. On citera plus particulièrement les défensines de plantes, de même que les peptides lytiques de toute origine, et plus particulièrement les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

Cellules végétales et plantes transgéniques

La présente invention concerne également des cellules végétales et des plantes transformées comprenant au moins une cassette d'expression d'une HPP oxydase, d'une HGAH ou d'une HGAC telles que définies ci-dessus.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, les cellules végétales ou les plantes comprennent une seule des cassettes d'expression selon l'invention choisie parmi les cassettes comprenant une séquence codante pour une HPP oxydase, une HGAH ou HGAC telles que définies précédemment.

Selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, les cellules végétales ou les plantes comprennent deux cassettes d'expression selon l'invention choisies parmi les cassettes comprenant une séquence codante pour une HPP oxydase, une HGAH ou HGAC telles que définies précédemment associées deux à deux dans un même vecteur : HPP oxydase et HGAH, HPP oxydase et HGAC, HGAH et HGAC.

Selon un troisième mode de réalisation de l'invention, les cellules végétales ou les plantes comprennent trois cassettes d'expression selon l'invention, une première cassette d'expression de l'HPP oxydase, une deuxième cassette d'expression de l'HGAH et une troisième cassette d'expression de l'HGAC.

Les cellules végétales ou les plantes selon l'invention telles que définies ci-dessus

peuvent également comprendre des cassettes d'expression d'autres protéines ou peptides d'intérêt définies précédemment.

De manière préférentielle, les cassettes d'expression sont intégrées de manière stable dans le génome des cellules végétales ou des plantes. Plus préférentiellement, les plantes selon l'invention sont fertiles, les cassettes d'expression selon l'invention étant transférées à leur descendance.

La présente invention concerne également des graines de plantes transgéniques ci-dessus, lesquelles graines comprennent une cassette d'expression selon l'invention codant pour une HPP oxydase, une HGAH ou une HGAC.

Les différentes cassettes d'expression dans les plantes transformées selon l'invention peuvent provenir soit de la même plante transformée parente, et dans ce cas la plante est issue d'un seul procédé de transformation/régénération avec les différentes cassettes d'expression contenues dans un même vecteur ou par co-transformation au moyen de plusieurs vecteurs. Elle peut également être obtenue par le croisement de plantes parentes contenant chacune au moins une cassette d'expression selon l'invention.

Transformation des cellules végétales et des plantes

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des cellules végétales et des plantes par introduction d'au moins une séquence d'acide nucléique ou une cassette d'expression selon l'invention telles que définies précédemment, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon l'invention.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules, des protoplastes ou des tissus avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*. D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG. L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

Lorsque l'on souhaite introduire plusieurs séquences d'acide nucléique ou cassettes d'expression, on peut le faire au moyen d'un seul vecteur selon l'invention comprenant

les différentes cassettes d'expression. Elles peuvent également être introduites dans l'organisme hôte par co-transformation au moyen de plusieurs vecteurs, chacun comprenant au moins une cassette d'expression.

D'une manière générale, les plantes transgéniques selon l'invention sont obtenues par transformation de cellules végétales puis régénération d'une plante, de préférence fertile à partir de la cellule transformée. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépend de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus. Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

Désherbage sélectif

L'invention a aussi pour objet un procédé de désherbage sélectif de plantes, notamment de cultures, à l'aide d'un inhibiteur de l'HPPD notamment un herbicide défini auparavant, caractérisé en ce qu'on applique cet herbicide sur des plantes transformées selon l'invention, tant en présemis, en prélevée qu'en postlevée de la culture.

La présente invention concerne également un procédé de contrôle des mauvaises herbes dans une surface d'un champ comprenant des graines ou des plantes transformées selon l'invention, lequel procédé comprend l'application dans la dite surface du champ d'une dose toxique pour les dites mauvaises herbes d'un herbicide inhibiteur d'HPPD, sans toutefois affecter de manière substantielle les graines ou plantes transformée selon l'invention.

La présente invention concerne également un procédé de culture des plantes transformées selon l'invention lequel procédé comprend le semis des graines des dites plantes transformées dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, l'application sur la dite surface du dit champ une dose toxique pour les mauvaises herbes d'un herbicide ayant pour cible l'HPPD défini ci-dessus en cas de présence de mauvaises herbes, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou

les dites plantes transformées, puis la récolte des plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement la séparation des graines des plantes récoltées.

Par « sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées », on entend selon l'invention que les plantes transformées selon l'invention soumises à une application d'une dose d'herbicide toxique pour les mauvaises herbes, présentent une phytotoxicité légère ou nulle. Par dose toxique pour les mauvaises herbes, on entend selon l'invention une dose d'application de l'herbicide pour laquelle les mauvaises herbes sont tuées. Par phytotoxicité légère on entend selon l'invention un pourcentage de feuilles blanchies inférieur à 25%, préférentiellement inférieur à 10%, plus préférentiellement inférieur à 5%. Il est entendu également selon la présente invention que l'application de la même dose toxique sur une plante autrement comparable non transformée, c'est à dire ne comprenant pas au moins une cassette d'expression selon l'invention, conduirait à observer sur ladite plante des symptômes de phytotoxicité supérieurs à ceux observés pour la plante transformée selon l'invention.

Dans les deux procédés ci-dessus, l'application de l'herbicide ayant pour cible l'HPPD peut être faite selon l'invention, tant en présemis, en prélevée qu'en postlevée de la culture.

Par herbicide au sens de la présente invention on entend une matière active herbicide seule ou associée à un additif qui modifie son efficacité comme par exemple un agent augmentant l'activité (synergiste) ou limitant l'activité (en anglais safener). Les herbicides inhibiteurs d'HPPD sont en particulier définis auparavant. Bien entendu, pour leur application pratique, les herbicides ci-dessus sont associée de manière en soi connue aux adjuvants de formulations utilisés habituellement en agrochimie

Lorsque la plante transformée selon l'invention comprend un autre gène de tolérance à un autre herbicide (comme par exemple un gène codant pour une EPSPS mutée ou non conférant à la plante une tolérance au glyphosate), ou lorsque la plante transformée est naturellement insensible à un autre herbicides, le procédé selon l'invention peut comprendre l'application simultanée ou décalée dans le temps d'un inhibiteur d'HPPD en association avec ledit herbicide, par exemple le glyphosate.

Les différents aspects de l'invention seront mieux compris à l'aide des exemples expérimentaux ci-dessous.

Toutes les méthodes ou opérations décrites ci-dessous dans ces exemples sont

données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans Coligan *et al.* (1995), Ausubel *et al.* (1995); Maniatis *et al.* (1982), Sambrook *et al.*

Les références bibliographiques citées précédemment sont intégrées par référence à la présente demande de brevet, en particulier les références bibliographiques définissant les séquences d'acide nucléique codant pour des HPPD natives, chimères ou mutées, éventuellement combinées avec un peptide signal ou peptide de transit.

Exemple I: IDENTIFICATION DU GENE CODANT L'HPP OXYDASE D'ARTHROBACTER GLOBIFORMIS

L'HPP oxydase (HPPO) convertit l'HPP en 4-HPA par une réaction de décarboxylation. Cette enzyme catalyse donc la première activité enzymatique nécessaire pour la construction de la voie métabolique contournant l'HPPD. L'activité HPP oxydase a été caractérisée dans des extraits bruts de *Rhodococcus erythropolis* S1 (Suemori *et al.*, 1995) ou dans un extrait partiellement purifiée d'*Arthrobacter globiformis* (Blakley, 1977). A notre connaissance, la protéine n'a pas été purifiée. Afin de pouvoir introduire cette activité enzymatique dans la plante, il est nécessaire d'en identifier le gène. Différentes approches sont envisageables: (1) la mutagenèse insertionnelle et donc l'identification du gène par la perte de l'activité enzymatique, (2) la complémentation fonctionnelle d'un microorganisme en utilisant une banque génomique, (3) la purification de la protéine pour remonter à la séquence nucléique.

Les trois approches furent utilisées. La complémentation fonctionnelle et la mutagenèse insertionnelle seront peu développées, ces techniques n'ayant pas permis d'identifier le gène HPPO.

I.1 Matériels et Méthodes

I.1.1- Les conditions de culture

I.1.1.1- Les milieux riches

Le milieu Luria-Bertani (LB; commercialisé par Bio101) est utilisé pour cultiver les bactéries (*E. coli*, *P. fluorescens*) lors des expériences de biologie moléculaire. Pour la culture d'*A. globiformis* on préférera le milieu Columbia-ANC enrichi avec 5% de

sang de mouton (BioMérieux). Ce milieu riche contient deux antibiotiques (acide nalidixique et colimycine) inhibiteurs des germes à Gram négatif. Bien que les trois bactéries poussent sur milieu riche à 37°C, on cultive en général *A. globiformis* et *P. fluorescens* à 29°C.

5 I.1.1.2- Le milieu de culture M^{4g}

Le milieu de culture décrit par Blakley (1977) précipite, il faut donc le filtrer avant utilisation. Nous avons changé progressivement le milieu afin d'atteindre un milieu "minimal" optimal. Les facteurs considérés sont la vitesse de croissance d'*A. globiformis* et l'activité enzymatique de l'HPPO. Le milieu retenu (M^{4g}) est un milieu
10 M9 (Maniatis *et al.*, 1982) légèrement modifié: Na₂HPO₄ 12 H₂O (6 g/L); KH₂PO₄ (3 g/L); NH₄Cl (1 g/L); NaCl (0.5 g/L); CaCl₂ (6 mg/L); FeSO₄ 7 H₂O (6 mg/L); extrait de levure (20 mg/L); et enfin le substrat (HPP ou tyrosine ou citrate) à la concentration 1g/L. Le milieu est autoclavé. Avant utilisation, 1 mL de MgSO₄ 1 M stérile est ajouté par litre de milieu.

15 Ce milieu minimum est aussi utilisé pour cultiver *P. fluorescens*.

I.1.2- Construction d'une banque génomique d'*Arthrobacter globiformis*

Il n'existe pas de technique fiable permettant de faire une banque de cDNA bactériens complets. Nous avons donc décidé de créer une banque génomique d'*Arthrobacter globiformis*. Pour la réaliser, nous choisissons le système cosmidique.
20 La banque cosmidique fut réalisée pour les expériences de complémentation fonctionnelle, puis fut utilisée plus tard pour rechercher le ou les cosmides contenant le gène *hppO*.

I.1.2.1- Le vecteur cosmidique pLAFR5

I.1.2.1.1- Description du vecteur

25 Nous choisissons le vecteur cosmidique conjugatif pLAFR-5 (Keen *et al.*, 1988) qui peut recevoir un insert d'environ 20 kb. Pourvu d'une origine de transfert et d'une origine de réplication à large spectre d'hôte à Gram négatif, il peut être transmis à d'autres genres bactériens par conjugaison tri-parentale ce qui peut être utile pour tester la complémentation fonctionnelle chez différents genres bactériens. Il confère une
30 résistance à la tétracycline.

I.1.2.1.2- Préparation du vecteur

Le plasmide pLAFR-5 est purifié par un protocole de lyse alcaline (Maniatis *et al.*, 1982), traité à la RNase puis digéré par *Bam* HI et *Sca* I. La digestion par *Bam* HI

permet d'ouvrir le site dans lequel seront "ligués" les inserts d'ADN génomique digéré par *Sau*3A. La digestion par *Sca* I permet de libérer les sites *cos* qui permettent l'encapsidation. Après extraction phénolique puis chloroformique, l'ADN est précipité à l'éthanol. L'ADN sec est solubilisé dans l'eau. Le vecteur ainsi préparé est conservé à -20°C.

I.1.2.1- Préparation de l'ADN génomique d'*A. globiformis*

Une culture de 24 heures (200 mL, 180 rpm, 29°C) réalisée dans le milieu (200 mL) décrit par Blakley (1977) est centrifugée à 3000 g à 4°C pendant 15 minutes. Le culot cellulaire, repris par 10 mL de solution de lyse (TE pH 8 ; 0,5 % SDS; 1 mg protéinase K), est incubé à 37°C au bain-marie avec une agitation douce toutes les 20 minutes. Au bout de 90 minutes, la suspension de cellules lysées est versée dans un tube JA-20 en polypropylène. On ajoute alors 10 mL de phénol/ chloroforme/ isoamylalcool (25/24/1) puis on centrifuge à 6 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est alors transféré dans un nouveau tube JA20 auquel on ajoute 1,8 mL d'acétate d'ammonium 10 M et 10 mL d'isopropanol. Après centrifugation à 20 000 g pendant 20 minutes à 4°C, le culot est rincé à l'éthanol 70 %. Le culot sec est repris avec 1 mL TE pH 8 puis transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL auquel 10 µL de RNase (10 mg.mL⁻¹) sont additionnés. Après 30 min à 37°C, 800 µL de phénol/ chloroforme/ isoamylalcool sont rajoutés. Après centrifugation, le surnageant est transféré dans un nouveau tube Eppendorf et extrait avec 0,8 mL de chloroforme. Le surnageant est alors transféré dans un dernier tube Eppendorf auquel 200 µL d'acétate d'ammonium 10 M et 800 µL d'isopropanol sont ajoutés. Après centrifugation, le culot est rincé à l'éthanol 70% puis, une fois sec, repris dans 500 µL d'eau. L'ADN génomique est alors stocké à -20°C.

I.1.2.3- Digestion ménagée de l'ADN génomique d'*A. globiformis*

Seuls les cosmides faisant 40-45 kb peuvent être encapsidés. Le vecteur faisant 21,5 kb, les inserts d'ADN génomique d'*A. globiformis* doivent avoir une taille comprise entre 19 et 22 kb. Ces fragments sont obtenus en réalisant une digestion ménagée de l'ADN génomique d'*Arthrobacter globiformis*. Pour définir les conditions optimales de la digestion ménagée nous réalisons des digestions de l'ADN génomique d'*A. globiformis* avec des quantités variables d'enzyme de restriction *Sau* 3A. Il apparaît que la meilleure condition de digestion utilise 0,08 unité enzymatique *Sau* 3A pendant 30 minutes à 37°C. L'ADN génomique ainsi digéré présente une taille comprise entre

15 et 22 kb. L'ADN génomique ainsi digéré est extrait au phénol puis au chloroforme et enfin précipité à l'éthanol.

I.1.2.4- Ligation de l'ADN génomique d'*A. globiformis* dans le vecteur cosmidique

5 La réaction de ligation se fait dans un volume final de 10 µL, contenant 500 ng de pLAFR-5 digéré par *Bam* HI et *Sca* I, 650 ng d'ADN génomique digéré par *Sau* 3A, 320 unités de T₄ DNA ligase (N.E.B.) et 5 mM d'ATP. La ligation se déroule à 12°C pendant la nuit (environ 16 heures). Les 5 mM d'ATP permettent d'éviter les ligations entre les extrémités franches (*Sca* I) (Feretti & Sgaramella, 1981) de telle sorte que les
10 dimères de vecteurs n'ayant pas d'insert ne puissent pas s'encapsider dans la tête des phages λ.

I.1.2.5- Encapsulation des cosmides et amplification de la banque cosmidique

L'encapsulation des cosmides, réalisée en utilisant le kit GIGAPACK II XL
15 (Stratagène) en respectant les instructions du fournisseur, assure une efficacité de transfection supérieure à celles obtenues avec les techniques classiques de transformation. Pour amplifier la banque cosmidique, Keen *et al.* (1988) conseillent d'utiliser les *Escherichia coli* DH-1 et HB101. En effet, lorsque ces souches sont cultivées sur maltose, elles produisent une protéine membranaire qui permet une
20 meilleure fixation du phage et donc une transfection plus efficace des cosmides. La banque, amplifiée en suivant les recommandations de Stratagène, est conservée à -80°C. Pour évaluer la banque cosmidique, l'ADN plasmidique isolé d'une trentaine de clone est digéré par *Apa* I ou *Eco* RI. Les profils de restriction sont observés sur gel d'agarose à 0,8%.

25 I.1.3- Purification de l'HPP oxydase

I.1.3.1- Test colorimétrique de l'activité HPP oxydase

Afin de pouvoir contrôler les étapes de purification, l'activité HPP oxydase est suivie en utilisant le test colorimétrique décrit par Blakley (1977). La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout de 2,4 dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH), en
30 solution dans l'HCl 2 M. La 2,4-DNPH réagit avec la fonction cétone en alpha d'une fonction carboxylique (ex : l'HPP). Il se forme ainsi une hydrazone que l'on peut révéler en alcalinisant le milieu. Lorsque l'HPP est converti en totalité en 4-HPA pendant la réaction enzymatique, l'hydrazone ne peut pas se former, on obtient donc, en milieu

basique, la couleur jaune caractéristique de la 2,4-DHPA. Si l'HPP n'est pas entièrement converti en 4-HPA lors de la réaction enzymatique, la formation d'hydrazone est possible. Ces hydrazones prennent une couleur brune en milieu basique. Une variation de coloration entre ces deux extrêmes est obtenue en fonction de la quantité d'HPP consommé. Les mesures d'absorption sont faites à 445 ou 450 nm. Afin de rendre ce test plus facilement manipulable, nous l'avons adapté au format microplaque à 96 puits. Le mélange réactionnel comprend GSH (900 μ M); HPP (135 μ M); TPP (1,8 mM); $MgCl_2$ (4,5 mM); FAD (4 μ M); tampon phosphate de potassium (90 mM) pH 7,4. Le mélange est conservé sur glace. Dans chaque puits on dépose 50 μ L de la fraction à tester et 150 μ L de mélange réactionnel. Après 20 min à 30°C, la réaction enzymatique est stoppée avec 13 μ L de solution 2,4-DNPH (0.1% dans HCl 2 M). Laisser réagir 20 min à température ambiante. On révèle la formation d'hydrazone en ajoutant 13 μ L de solution NaOH 10 M. Pour réaliser la gamme étalon, des mélanges réactionnels avec des concentrations variables d'HPP sont préparés. Les 50 μ L de fraction protéique sont remplacés par 50 μ L de tampon d'extraction de la protéine. La courbe étalon est réalisée pour chaque nouvelle solution de 2,4-DNPH (la solution de 2,4-DNPH est stable 6 mois à l'obscurité). L'avantage de ce test est sa rapidité, sa simplicité, mais il a le défaut de mesurer une disparition de substrat et non pas une apparition de produit. En outre, la possibilité d'avoir des faux positifs existe : une activité tyrosine amino-transférase donnera le même résultat que l'activité de l'HPPO. En effet, dans les deux cas, la fonction cétone a disparu. Nous avons donc développé une méthode HPLC rapide et sensible qui permette de confirmer la production de 4-HPA.

I.1.3.2- Test d'activité analysé par HPLC

Une méthode HPLC a été mise au point en utilisant une petite colonne Sphérisorb ODS2 50 x 4,6 mm et de granulométrie 3 μ m. La chromatographie est réalisée en isocratique A: 90%; B: 10% (où tampon A: H_2O 0,1% TFA et tampon B: acétonitrile), débit 0,8 mL.min⁻¹ et l'élution est suivie à 230 nm. Dans ces conditions, il est possible de séparer le 4-HPA, l'HGA, le 3,4-DHPA et l'HPP en 5 minutes après l'injection. La colonne a été réalisée à façon par Merck.

I.1.3.3- Purification de la protéine

Lors de la mise au point de ce protocole, un souci de simplicité a été recherché.

I.1.3.3.1- Tests préliminaires

Les tests préliminaires ont pour but de déterminer l'influence de composés

(NaCl, KCl, propanol-1, éthylène glycol, etc ...) et du pH sur l'activité enzymatique. Les réactions sont réalisées avec des extraits bruts d'*A. globiformis* cultivé sur milieu M^{4g} contenant de la tyrosine comme seule source de carbone (M^{4g}-tyrosine). Le composé à tester est ajouté dans le milieu réactionnel. Pour mesurer l'influence du pH sur l'activité enzymatique de l'HPPO, différents tampons phosphate sont réalisés.

I.1.3.3.2- Protocole de purification

La souche d'*Arthrobacter globiformis* est étalée sur milieu gélosé LB ou sur milieu gélosé Columbia-ANC. Après 16 heures de culture à 29°C, une colonie est prélevée et ensemencée dans 5 mL de milieu LB, en croissance pendant 8 heures à 29°C, 180 rpm. 50 µL de cette préculture sont alors inoculés dans 1,5 L de milieu M^{4g}-Tyrosine ou M^{4g}-HPP, la culture est alors réalisée à 29°C, 180 rpm, dans des Erlenmeyer à ailettes (Belco). Après 48 heures de culture, les cellules sont collectées par centrifugation à 5 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les cellules sont remises en suspension dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,4 puis centrifugées comme précédemment. Le culot est repris dans 2 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Les cellules sont soniquées (Vibra Cell, Sonic Materials INC., Connecticut, USA) pendant 15 minutes, puissance 4, pulse de 30%, dans la glace fondante. Les débris insolubles sont éliminés par une centrifugation de 25 min à 20 000 g, 4°C. Le surnageant est récupéré, il constitue "l'extrait brut". Il peut être congelé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C (pendant 6 mois sans perte apparente d'activité). L'extrait brut est chargé, sans dessalage préalable, sur une colonne échangeuse faible d'anions 'EMD/DEAE 650 S' (Merck) équilibrée en tampon phosphate 50 mM pH 7,4. L'élution de l'activité enzymatique est obtenue en appliquant un gradient de concentration de NaCl (en solution dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Les fractions contenant l'activité enzymatique sont rassemblées. La solution protéique obtenue est diluée d'un facteur 2,7 avec du tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Les protéines sont alors chargées sur une colonne (XK16, Pharmacia) échangeuse forte d'anions 'source Q' (30 mL, Pharmacia) préalablement équilibrée avec un tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Les fractions protéiques intéressantes, identifiées par l'activité enzymatique, sont rassemblées puis concentrées sur membrane UVIKON 10 kDa. L'extrait protéique résultant est alors dessalé par la technique de gel-filtration en utilisant une colonne 'PD10' (Pharmacia) équilibrée en tampon phosphate 10 mM pH 7,4 et élué avec ce même tampon. Les protéines sont alors déposées sur une colonne (XK9/15, Pharmacia)

d'hydroxyapatite (2 mL; Hydroxyapatite DNA grade Bio-Gel®HTP gel; Bio-Rad) équilibrée avec 10 mM tampon phosphate pH 7,4. On élue l'activité enzymatique en appliquant un gradient phosphate. Les fractions contenant l'activité enzymatique sont rassemblées et concentrées. On conserve les protéines actives lorsque la concentration
5 protéique est supérieure à 1 mg/mL en ajoutant du FAD, GSH et glycérol afin d'obtenir les concentrations finales suivantes : 27 μ M FAD, 110 μ M GSH, 0,8% glycérol. Les protéines ainsi préparées peuvent être congelées à -80°C pendant au moins 6 mois.

I.1.3.3.3- Dosage des protéines

Le dosage des protéines se fait selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant
10 la γ -globuline pour standard.

I.1.3.3.4- Coloration des gels de protéines

Les fractions protéiques sont analysées sur gel de polyacrylamide à 10 % selon la méthode de Laemmli (1970). Après migration, les protéines du gel sont colorées soit en utilisant la méthode au Bleu de Coomassie (Chua, 1980) soit en utilisant la méthode au
15 nitrate d'argent (Schoenle *et al.*, 1984).

I.1.4- Microséquençage protéique de l'extrémité N-terminale et de peptides internes

Le microséquençage de la protéine est réalisé en utilisant la méthode d'Edman (Laursen, 1971). Pour obtenir les meilleurs résultats lors du séquençage, le gel est
20 préparé le jour même.

I.1.4.1- Préparation du gel d'acrylamide et son électrophorèse

Les gels (8,5%, 10% ou 12%) sont réalisés selon la méthode de Laemmli (1970) en utilisant le système de minigels d'Hoefer®. Les protéines sont diluées au tiers avec une solution 'bleu de dépôt dénaturant' (Tris-HCl 150 mM pH 6,8; SDS 4 %; β -
25 mercaptoéthanol 2% (v/v); glycérol 3,3% (v/v); bleu de Bromophénol 0,03% qsp 10 mL d'eau milliQ). Après avoir été bouillies 5 minutes, les protéines sont chargées sur le gel d'acrylamide. La migration est réalisée à température ambiante en utilisant un tampon de migration dénaturant (Tris base 25 mM; glycine 250 mM; β -mercaptoéthanol 0,014% (v/v); SDS 0,1 %) et en appliquant une intensité de 15 mA par gel.

I.1.4.2- Préparatifs pour le séquençage de l'extrémité N-terminale

Afin de pouvoir réaliser le séquençage de l'extrémité N-terminale, le gel est transféré sur membrane PVDF (PROBLOTT® - Applied Biosystems) en utilisant la technique de transfert semi-sec. L'électrotransfert des polypeptides se fait en 30 minutes

à 300 mA avec l'appareil 'Semy Dry Electrophorator' (Bio-Rad) et dans un milieu à base de CAPS (tampon de transfert: CAPS 10 mM pH 11,0; méthanol 10% (v/v)). Le tampon de transfert ne contient pas de glycine qui risquerait de "polluer" le séquençage. Après le transfert, la membrane est rincée quelques secondes à l'eau milliQ. Elle est alors
5 immergée quelques secondes dans une solution de coloration à base d'amido-schwarz (Aldrich; ref: 19,524-3). La solution est constituée de méthanol 45% (v/v), d'acide acétique 1% (v/v), d'amido-schwarz 0,1% (m/v) et d'eau 63,9% (v/v). Lorsque la bande correspondante à la protéine d'intérêt est visible, la membrane est rincée abondamment à l'eau milliQ puis elle est séchée à l'air. La partie de la membrane contenant la protéine
10 d'intérêt (60 kDa) est découpée et envoyée pour le séquençage.

I.1.4.3- Préparatifs en vue du séquençage des peptides internes

Pour visualiser les protéines dans le gel, on utilise un protocole de coloration à l'Amido-Schwarz légèrement différent de celui utilisé pour colorer la membrane PVDF. Après migration, le gel est fixé deux fois trente minutes avec une solution constituée de
15 méthanol 50 %, d'acide acétique 10 %, d'eau milliQ 40 %. La coloration est réalisée avec une solution constituée de méthanol 45 %, d'acide acétique 10 %, d'eau 45 %, d'Amido-Schwarz 0,003 % (p/v). Les protéines apparaissent progressivement. Lorsque la coloration est suffisante pour repérer la protéine, le gel est rincé abondamment à l'eau milliQ. La bande d'intérêt est découpée puis deshydratée au speed-vac (Savant). La
20 bande de gel, ayant perdue environ un tiers de sa longueur, est envoyée pour le séquençage. Les peptides internes sont obtenus après digestion de la protéine par l'endoprotéase Lys-C (sequencing grade Boehringer). La protéine dans le gel de polyacrylamide est digérée dans 150 µL de tampon Tris-HCl pH 8,6 (0,1 M) contenant 0,03% de SDS, à 35°C pendant 18 heures en présence de 0,4 µg d'endoprotéase Lys-C.
25 La protéine digérée est injectée sur colonne HPLC DEAE-C18 (diamètre 1 mm); les peptides sont élués en utilisant un gradient d'acétonitrile (de 2 à 75 %) contenant du TFA à 0,1%. L'endoprotéase Lys-C clive spécifiquement les polypeptides du côté carboxylique des lysines.

I.1.5.1- Validation théorique en utilisant le gène *MndD* d'*Arthrobacter globiformis*

30

Une partie (867 pb) du gène *MndD* est amplifiée par PCR en utilisant les amorces 'OZ-MndD-S711': ACGTCACCGA AGAGGATGAA AAC et 'OZ-MndD-AS1578': ACGGCCATTT CGGACTTTTC. La PCR est réalisée en utilisant le programme suivant:

95°C 5 min; 25 cycles: 95°C 45 sec, 56°C 45 sec; 72°C 1 min; 72°C 5 min; 4°C en attente. Le mélange réactionnel comprend 200 à 500 µM de dNTP, 20 à 200 ng d'ADN cosmidique ou génomique et 100 pmol de chaque amorce dans un volume final de 50 µL.

5. I.1.5.2- Identification par PCR d'une partie du gène codant l'HPP oxydase

La PCR est réalisée en utilisant le kit 'Advantage®-GC Genomic PCR' (Clontech). Ce kit comprend, entre-autres, un adjuvant à base de bétaine 'GC melt' et un mélange de polymérases thermorésistantes - principalement avec de la *Thermus thermophilus* (*Tth*) -. L'amplification est réalisée sur l'ADN génomique d'*Arthrobacter globiformis*, en utilisant la programmation suivante : 94°C 5 min; 30 cycles: 94°C 20 sec, 60°C 30 sec, 72°C 3 min; 72°C 6 min; 4°C en attente. Les conditions réactionnelles sont 400 µM dNTP, 50 ng d'ADN génomique, 100 pmol de chaque amorce, 'GC melt' 1X, pour un volume réactionnel de 50 µL. Dans ces conditions, nous amplifions une bande de 937 pb que nous dénommons Z2.

15 L'amplification par PCR peut être aussi réalisée en utilisant la *Tth* d'Epicentre ou la *Tbr* (*Thermus brockianus* - Finnzyme). La *Tbr* est la seule polymérase thermorésistante testée à pouvoir réaliser la PCR sans additifs (DMSO, glycérol, bétaine); c'est en outre une enzyme de haute fidélité.

I.1.6- Criblage de la banque cosmidique

20 Le criblage de la banque cosmidique est réalisé en utilisant la technique des sondes froides marquées à la dioxygénine (Boehringer Mannheim, 1995).

I.1.6.1- Préparation de la sonde Z2-Dig

Le marquage de la sonde à la digoxygénine est faite par PCR dans un volume final de 50 µL, dans les conditions définies au paragraphe II.5.2, sauf pour le mélange de dNTP constitué par : dUTP-Dig 90 µM; dTTP 135 µM; dATP 225 µM; dCTP 225 µM; dGTP 225 µM. On quantifie la sonde amplifiée en déposant 3µL de la réaction sur un gel agarose à 0,8%. Il apparaît un léger bruit de fond, c'est à dire que la PCR n'est pas suffisamment spécifique. Afin d'éviter tous problèmes ultérieurs, la totalité de la PCR est déposée sur gel et la bande d'intérêt est extraite en utilisant le kit Qiaex II

30 (Qiagen).

I.1.6.2- Transfert de la banque cosmidique sur membrane Hybond N

Le stock glycérol de la banque cosmidique réalisée dans *E. coli* HB101 est utilisé pour inoculer 2 mL de milieu LBT¹⁵. Après 8 heures de croissance la DO₆₀₀ est

estimée; des dilutions en cascade sont réalisées afin d'étaler environ 1000 clones par boîte (144 cm²). Après 16 heures de croissance à 37°C, les bactéries sont transférées sur des membranes Hybond N (Amersham) et lysées en suivant les recommandations de Boehringer Mannheim (1995). L'ADN libéré est fixé à la membrane par exposition aux U.V. (120 mJ délivrés en 45 sec – Stratalinker ; Stratagène). Les membranes sont débarrassées des débris cellulaires en réalisant le traitement à la protéinase K comme préconisé par Boehringer Mannheim (1995).

I.1.6.3- Préhybridation - hybridation - détection

Les étapes de préhybridation et hybridation se font dans un sac disposé sur un plateau à bascule, en utilisant la technique d'hybridation avec la sonde marquée à la digoxygénine (Boehringer Mannheim, 1995). La préhybridation (5x SSC; 0,5% SDS; 0,1% N-laurylsarcosine; 1% agents bloquants (Boehringer Mannheim, ref: 1096 176); 100 µg.mL⁻¹ sperme de saumon soniqué et dénaturé) est réalisée pendant 4 heures à 65°C. L'hybridation de la membrane est faite pendant la nuit à 68°C (milieu préhybridation frais contenant 20 ng.mL⁻¹ de sonde marquée à la digoxygénine et dénaturée pendant 5 min à 100°C). Le lendemain, l'excès de sonde et les hybridations aspécifiques sont éliminées par quatre lavages avec le tampon A (0,5x SSC ; 0,1% SDS, 65°C). Les membranes sont alors équilibrées pendant 5 min à température ambiante dans le tampon B (acide malique 138 mM, NaCl 142 mM, ajusté à pH 7,5 avec des pastilles de soude, 0,3% tween 20). Puis elles sont saturées par des agents bloquants (Boehringer Mannheim) durant 30 minutes avant d'être hybridées avec l'anticorps Anti-Digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline ('Anti-Digoxigénine-AP, Fab fragments' ; Boehringer Mannheim) dilué au 1/10000 dans une solution fraîche d'agents bloquants. Après 30 minutes, les membranes sont rincées deux fois 15 minutes dans du tampon B, puis équilibrées 5 minutes dans le tampon réactionnel de la phosphatase alcaline (Tris 0,1 M; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 0,05 M pH 9,5). Les membranes sont recouvertes avec 1 mL de CSPD prêt à l'emploi puis incubées 15 min à 37°C. Cette étape à 37°C permet une activation rapide de la phosphatase alcaline couplée à l'anticorps. On révèle les membranes en exposant des Hyperfilm® ECL (Amersham) pendant 1 à 15 minutes.

I.1.6.4- Analyse des cosmides positifs par Southern et PCR

Les cosmides identifiés lors de l'hybridation sur membrane sont confirmés par PCR et par la technique de Southern. Dans ce cas, l'ADN cosmidique, purifié par lyse alcaline (Maniatis *et al.*, 1982), est digéré par des enzymes de restriction puis séparé sur

gel d'agarose à 0,8 %. Les gels sont transférés sur membrane Hybond N⁺ (Amersham) par la technique de Southern en 20x SSC (Ausubel *et al.*, 1995). Après transfert, la membrane est rincée au 2x SSC, puis l'ADN est fixé à la membrane grâce aux U.V. (120 mJ délivrés en 45 sec – Stratalinker ; Stratagène). La membrane est alors révélée en utilisant la technique de sonde froide décrite précédemment.

I.1.7- Vecteurs de clonage et bactéries hôtes

Les séquences d'ADN amplifiées par PCR sont généralement clonées dans le plasmide p-GEMT-easy (Proméga) qui permet un criblage par la technique "bleu-blanc". Pour la surexpression, on utilise le plasmide pKK223-3 (Pharmacia) qui place le gène sous la dépendance d'un promoteur *tac*. Les clonages sont généralement réalisés en utilisant *E. coli* DH5 α (New England Biolabs) ou *E. coli* XL1 Blue (Stratagène). Pour la surexpression on préférera *E. coli* BL21(DE3).

I.1.8- Activité enzymatique de l'acétolactate synthase (ALS)

L'activité acétolactate synthase (ALS) est mesurée en utilisant la méthode colorimétrique décrite par Chang et Duggleby (1997). Les réactions sont conduites en microplaques avec un volume total de 250 μ L. Pour chaque réaction, 25 μ L d'enzyme sont incubées 30 min à 37°C dans 225 μ L de milieu réactionnel constitué de KPi 50 mM pH 7,0; pyruvate de sodium 50 mM ; TPP 1 mM ; MgCl₂ 10 mM ; FAD 10 μ M. La réaction est arrêtée par ajout de 25 μ L d'H₂SO₄ 10 %. Les microplaques alors sont incubées à 60°C pendant 15 min. Puis on ajoute 250 μ L de créatine 0,5 % et 250 μ L d' α -naphtol à 5 % dans du NaOH 4 M (la solution d' α -naphtol doit être préparée moins de 10 min avant usage). La microplaque est alors incubée 15 minutes à 60°C puis 15 minutes à température ambiante. Une couleur rouge cerise apparaît. La lecture est réalisée à 525 nm ($\epsilon_M = 22\,700\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

I.2- Résultats - Discussion

L'HPP oxydase est la première activité enzymatique que nous souhaitons introduire dans la plante dans le cadre de la création de la voie métabolique contournant l'HPPD. Afin de pouvoir identifier le gène codant l'activité HPP oxydase différentes approches furent développées: (1) la mutagenèse insertionnelle et donc l'identification du gène par la perte de l'activité enzymatique, (2) la complémentation fonctionnelle d'un microorganisme en utilisant une banque génomique, (3) la purification de la protéine pour remonter à la séquence nucléique. C'est la troisième voie qui a été préférée.

I.2.1- Purification de l'HPPO

I.2.1.1- Optimisation des conditions de culture

Avant de commencer à purifier la protéine, il est utile de déterminer quels sont les conditions de culture qui permettent son expression dans la bactérie. Les résultats d'optimisation des conditions de culture montrent que l'activité HPP oxydase n'est pas détectable lorsque la croissance d' *A. globiformis* est faite au dépend d'une source de carbone telle que le succinate, le fumarate ou le glucose. Par contre l'activité HPP oxydase est détectée lorsqu' *A. globiformis* est cultivé en utilisant l'HPP, la tyrosine ou la phénylalanine comme seule source de carbone. Si l'on augmente la quantité d'extrait de levure (par exemple 200 mg.L⁻¹ au lieu de 20 mg.L⁻¹) on observe une diminution de l'activité enzymatique produite. Sur la base de ces observations, le milieu M^{As} est défini. Enfin, on observe qu'une culture à forte densité (en début de phase stationnaire ; DO₆₀₀ ~ 1) présente une activité enzymatique HPP oxydase plus faible que dans le cas d'une culture en phase exponentielle de croissance (DO₆₀₀ ~ 0,4).

I.2.1.2- Tests préliminaires

Nous venons de définir le milieu optimal pour la production de l'HPPO, nous allons maintenant rechercher les conditions qui n'altèrent pas la stabilité de l'activité HPP oxydase lors des processus de purification. Pour les chromatographies impliquant les résines échangeuses d'anions et les chromatographies en fonction du pH, il est important de connaître la sensibilité de l'enzyme au pH et aux sels. Nous observons que le pH optimum est compris entre pH 7,0 et 7,8 ainsi que l'avait déjà démontré Blakley (1977). L'enzyme semble peu sensible aux sels (NaCl et KCl) puisqu'il faut des concentrations supérieures à 750 mM pour observer une baisse de l'activité enzymatique. Nous connaissons maintenant les conditions permettant une bonne expression de l'activité enzymatique et nous avons déterminé la sensibilité de l'activité HPP oxydase à des facteurs pouvant intervenir lors de la purification. La purification de l'HPPO peut donc commencer.

I.2.2.3- Purification de l'HPPO

Pour purifier l'HPPO, on applique le protocole décrit précédemment. L'activité enzymatique est éluée de la DEAE EMD 650S avec 150 à 200 mM de NaCl en solution dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Les fractions contenant l'activité enzymatique sont rassemblées et conservées pendant la nuit à 4°C. En effet la congélation à cette étape entraîne une perte d'activité. Les protéines sont ensuite

chargées sur une résine Source Q. L'activité enzymatique est alors éluée avec une concentration en NaCl comprises entre 150 et 200 mM en solution dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Les fractions contenant l'activité enzymatique sont rassemblées puis concentrées sur membrane UVIKON 10 kDa, et conservées à 4°C pendant la nuit. Enfin l'HPPO est purifiée lors d'une troisième étape en appliquant un gradient phosphate sur colonne d'hydroxyapatite. L'activité est éluée avec une concentration de phosphate voisine de 30 mM. Les fractions contenant l'activité enzymatique HPP oxydase, en sortie de colonne d'hydroxyapatite, sont alors analysées sur un gel SDS-PAGE à 8,5% coloré au nitrate d'argent. Le gel présente l'évolution de deux bandes protéiques. Par comparaison entre le profil d'activité enzymatique et le profil d'élution des protéines, nous considérons que l'HPPO correspond à la protéine de plus haut poids moléculaire (environ 60 kDa). Dans l'essai présenté, la purification est initiée avec 1,5 g de protéines solubles extraites d'*A. globiformis* et nous avons récupéré 150 µg d'un mélange de protéines (dont environ 70 µg d'HPPO). Le facteur de purification en terme d'activité spécifique n'a pas été déterminé. En effet, nous utilisons des conditions de réaction totale pour suivre l'élution de l'activité enzymatique. En outre, la problématique était davantage l'identification de la protéine que la mise au point d'un protocole de purification. L'analyse HPLC, des réactions faites au sortir de chaque étape de purification, montre l'apparition d'un produit qui présente le même temps de rétention que le standard 4-HPA (SIGMA). Quarante picomoles de la protéine HPPO (60 kDa) sont transférées sur une membrane PVDF et sont envoyées pour le séquençage en même temps que 40 pmol de la protéine incluse dans le gel d'acrylamide. Les protéines transférées sur membranes servent à déterminer la séquence N-terminale tandis que les protéines incluses dans le gel sont utilisées pour déterminer la séquence de peptides internes.

I.2.2.4- Résultats de séquençage de l'HPPO

Peu de peptides internes sont obtenus en sortie d'HPLC après digestion de l'HPPO par l'endoprotéase Lys-C. Ce résultat suggère que la protéine contient peu de lysine, en effet l'endopeptidase Lys-C coupe après les lysines. Si la lysine est peu fréquente, la digestion par l'endopeptidase K génère des fragments peptidiques longs qui restent adsorbés dans la colonne et ne peuvent pas être élués, même en utilisant des conditions très hydrophobes. En se basant sur la forme des pics chromatographiques ainsi que sur la quantité apparente, on sélectionne puis on séquence trois peptides. Leur

dénomination est fonction de leur ordre de sortie de la colonne HPLC: peptide N°4, peptide N°6, peptide N°11. Leur séquence est respectivement: (A) WWAEALK, AAAGRILRL DDAAGANASK, XDNRF TAVDE XT (où X est un acide aminé non déterminé). La séquence des 30 premiers acides aminés N-terminaux est obtenue avec un rendement initial de 40 %: TSLTVSGRVA QVLSSYVSD VFGVMGNGNV Y. L'acide aminé (méthionine ou valine) correspondant au codon initiation (ATG ou GTG) n'est pas retrouvé. Le rendement initial obtenu (15 pmol équivalent BSA), comparé avec celui obtenu pour les peptides internes (30 à 35 pmol équivalent BSA), suggère qu'une partie des protéines étaient bloquées en N-terminal. La séquence N-terminale et les séquences internes obtenues ne présentent aucune homologie dans les bases de données. En nous basant sur les séquences peptidiques obtenues, des oligonucléotides dégénérés sont synthétisés afin d'identifier le gène *HPPO* par PCR.

I.2.3- Validation des techniques PCR et identification d'une partie du gène *hppO*

I.2.3.1- Validation des techniques PCR

La teneur en base guanine et cytosine (GC %) de la majorité des ADN génomiques des *Arthrobacter sp.* est comprise entre 59 et 66 %, cependant il est de 67 à 69 % pour *A. agilis* (anciennement *Micrococcus agilis*) (Koch *et al.*, 1995), de 70 % pour *A. atrocyaneus* (Jones *et al.*, 1991) et de 73 % pour un *Arthrobacter sp.* identifié dans les glaces arctiques (Junge *et al.*, 1998). Ces fortes teneurs en guanine et cytosine peuvent rendre plus difficile la mise en œuvre de la PCR. Pour cette raison que nous avons validé nos méthodes PCR (ADN génomique, polymérases, ...) en utilisant le gène codant la 'Manganese dependent Dioxygenase' (*MndD*) d'*Arthrobacter globiformis* (Boldt *et al.*, 1995). Cette enzyme de la voie de dégradation de l'HPP catalyse l'ouverture du cycle aromatique du 3,4-dihydroxyphénylacétate. Pour l'amplification contrôle du gène *MndD*, nous avons testé des polymérases thermorésistantes de *thermophilus aquaticus* (Taq) commercialisées par différents fournisseurs (Perkin Elmer, ATGC, Appligène, Qiagen, Sigma). Dans tous les cas, l'amplification du gène *MndD* est obtenue. Cependant, dans des conditions équivalente, en utilisant les amorces dégénérées codant les peptides de l'HPPO, l'amplification du gène *hppO* n'est pas obtenue même en utilisant des additifs (DMSO, glycérol).

I.2.3.2- Identification par PCR de la partie N-terminale du gène *hppO*

Nous amplifions de manière spécifique une séquence d'ADN de 936 pb qui

pourrait correspondre à la partie N-terminale du gène *hppO*. L'amplification est obtenue en utilisant d'une part les amorces dégénérées OX3: TTNGCNCCNG CNGCRTCRTC et OZ10N: GAYGTNTTYG GNGTNATGGG NAAAYGG correspondant respectivement à une partie du peptide N°6 et à une partie de la séquence peptidique N-terminale et d'autre part le kit 'Advantage GC Genomic PCR' (Clontech). Le kit de Clontech est conçu pour réaliser des PCR sur des génomes riches en bases GC. Il contient un mélange de polymérases thermorésistantes (dont la *Tth*) et un additif à base de bétaine. La *Tth* est une polymérase thermorésistante purifiée à partir de *Thermus thermophilus*. La dégénérescence de chaque amorcé est de 1024; c'est à dire qu'une amorce sur 1024 présente la séquence nucléique exacte du gène recherché. La dégénérescence provient du fait qu'un acide aminé peut être codé par plusieurs codons, pour exemple, l'alanine est codée par quatre codons (GCA, GCC, GCG, CGT). Le code de dégénérescence utilisé pour les amorces est défini comme suit : N = A ou T ou G ou C ; R = A ou G ; Y = T ou C. Les températures théoriques d'hybridation sont respectivement de 55,4°C et 57,6°C. Malgré une température d'hybridation de 60°C utilisée lors de la PCR, l'amorce OX3 seule permet des amplifications non spécifiques. Nous avons amplifié par PCR un fragment d'ADN de 936 pb de manière spécifique en utilisant deux amorces dégénérées. Nous devons nous assurer que cet ADN amplifié correspond bien au gène *hppO* recherché.

12.4- Caractéristique du fragment d'ADN de 936 pb

Le fragment d'ADN de 936 pb, amplifiée par PCR, est purifié sur gel d'agarose. Il est alors cloné dans pGEM-T easy, selon les instructions du fournisseur, puis séquencé. Lorsque l'on traduit la séquence nucléique obtenue, on observe qu'elle code aux deux extrémités pour la totalité du peptide N°6 et pour une bonne partie de la séquence N-terminale. Nous sommes donc sûr d'avoir amplifié une partie du gène codant la protéine purifiée et microséquencée, l'HPPO. La séquence nucléique contient 73% de bases guanine (G) et cytosine (C) on note en outre la possible formation de structures secondaires dites "en épingles à cheveux" (*stem-loop*) dans les 250 premières bases de l'ARN messenger. Cette haute teneur en bases G et C ainsi que l'existence de ces structures secondaires peuvent expliquer en partie les difficultés rencontrées pour parvenir à l'amplification par PCR d'une partie de ce gène. La séquence nucléique de 936 pb ainsi que la séquence protéique correspondante ne présentent pas d'homologies avec les séquences enregistrées dans les bases de données. Nous possédons maintenant

une séquence de 936 pb, orientée de N-terminal vers le peptide interne N°6. La protéine faisant environ 60 kDa, nous recherchons un gène d'environ 1650 pb. Il reste donc à identifier environ 700 pb. Pour cela nous allons cribler la banque génomique d'*A. globiformis* réalisée dans le cosmide pLAFR5 et amplifiée dans *E. coli* HB101.

5 I.2.5- Criblage de la banque cosmique d'*A. globiformis*

La banque génomique réalisée est transférée sur membrane, puis criblée en utilisant, comme sonde, le fragment d'ADN de 936 pb marqué à la digoxygénine. Le protocole standard est adapté pour un ADN "classique" (60% AT), tandis que le fragment de 936 pb présente une proportion estimée de 23% AT. Si nous gardons le même rapport d'UTP-Dig/dTTP que dans le cas d'un ADN classique nous obtenons une sonde faiblement marquée donc une détection moins sensible. Nous avons donc optimisé la proportion d'UTP-Dig/dTTP nécessaire pour le marquage de la sonde (paragraphe II.7.1). Le criblage de la banque génomique a permis d'identifier quatre cosmides (Cos1A, Cos2A, Cos4A, Cos17A1) ayant des profils de restriction différents.

15 En comparant les résultats d'hybridation de Southern obtenus à partir des cosmides avec ceux obtenus à partir de l'ADN génomique d'*Arthrobacter globiformis*, nous sélectionnons le cosmide 2A. La figure N°14 illustre la démarche utilisée en prenant pour exemple la digestion des cosmides par l'enzyme de restriction *Not* I. Nous observons tout d'abord que le vecteur cosmique pLAFR5, digéré par *Not* I, n'hybride

20 pas avec la sonde Z2-Dig. Par contre, nous observons que le cosmide 1A présente une seule bande d'hybridation à 2,3 kb alors que les cosmides 2A, 4A et 17A présentent deux bandes d'hybridation à 4,3 et 2,3 kb. Or la digestion du génome d'*A. globiformis* par *Not* I produit deux bandes de 4,3 et 2,3 kb; de fait nous considérons que le cosmide 1A ne contient pas toute l'information que nous recherchons. En nous basant sur

25 d'autres restrictions et en utilisant une démarche équivalente nous éliminons les cosmides 4A et 17A. Le Cosmide 2A est alors séquencé sur une distance d'environ 3 kb de part et d'autre du site *Not* I identifié au milieu de la sonde Z2-Dig. Les résultats d'hybridation de l'ADN génomique montrent en outre que le gène est présent à une seule copie. Nous avons identifié le cosmide 2A que nous avons fait séquencer sur 6,2

30 kb. Nous allons maintenant pouvoir analyser cette séquence d'ADN issue de génome d'*Arthrobacter globiformis*.

I.2.6- Analyse globale de 6,2 kb d'ADN génomique d'*Arthrobacter globiformis*.

En utilisant le logiciel Vector Nti, la position des gènes potentiels est définie à partir de la séquence nucléique de 6255 pb obtenue en séquençant le cosmide 2A. Nous retrouvons la séquence de 936 pb, identifiée par PCR, comme faisant partie d'un gène potentiel. Ce gène potentiel correspond donc vraisemblablement au gène *hppO*. Quatre autres gènes (A, B, C, D) sont potentiellement identifiés (Figure 3) en effectuant une recherche par homologie en utilisant l'algorithme BLASTX. Le gène A coderait un transporteur d'acide aminés, le gène B coderait une histidinol-phosphate aminotransférase cependant de précédents travaux montrent que cette enzyme possède l'activité tyrosine aminotransférase chez la bactérie à Gram positif *Bacillus subtilis* (Nester & Montoya, 1976), le gène C coderait un régulateur de transcription, tandis que le gène D coderait un régulateur d'opéron.

I.2.7- Analyse du gène *hppO*

I.2.7.1- Description générale

Sur la séquence obtenue de 6256 pb, le gène *hppO* (en vert) est délimité en 5' par le codon d'initiation ATG en position 3143 et en 3' par le codon stop TAG (en rouge) en position 4823. Le gène présente donc une longueur réelle de 1680 pb. Il présente une forte teneur en bases G et C (71,4 % GC). La recherche d'homologies au niveau des séquences nucléiques (BLASTN), ne permet aucune identification. Afin de mieux caractériser le gène, nous recherchons les éléments spécifiques de la transcription et de la traduction.

I.2.7.2- Eléments caractérisant la transcription et la traduction du gène *hppO*

Nous identifions les potentielles boîtes promotrices de la transcription (Figure 4). La boîte « -10 », dite « boîte de Pribnow », est située entre les positions 3082 à 3088 (AAAAATA) et la boîte « -35 » est située en position 3055 à 3059 (TTGCA). Les boîtes ainsi définies sont légèrement différentes des séquences canoniques (respectivement TATAAT et TTGACA ; Singer & Berg, 1992). Cela peut refléter une interaction faible avec les facteurs permettant la transcription constitutive ou bien la nécessaire interaction avec des facteurs de transcription différents. L'adénine en position 3096 pourrait être la base d'initiation de la transcription. Enfin nous identifions entre les positions 3068 à 3072 (TGTGA) une séquence correspondant au site d'attachement de la protéine CAP (*catabolic gene activator protein*). Le fait de retrouver ce site de

fixation de la protéine CAP va dans le sens des résultats obtenus lors de l'optimisation des conditions de culture. En conclusion la transcription du gène *hppO* est vraisemblablement sous le contrôle d'un promoteur faible, notamment régulé par le glucose. La séquence de Shine-Dalgarno (Singer & Berg, 1992) permet la fixation de la petite sous unité ribosomique. Elle est identifiée (GACGAT; en position 3131 à 3136) 12 bases en amont du codon d'initiation (ATG) de la traduction, par analogie avec la séquence consensus AGGA. On observe en outre que la partie 5' terminale (environ 250 bases) de l'ARN messenger est capable de se structurer en épingle à cheveux (*stem-loop*). Or la structure secondaire de la région de l'ARNm qui avoisine l'ATG initiateur influence l'étape d'initiation de la traduction. Ainsi l'initiation est nulle ou peu efficace lorsque l'ATG initiateur ou la séquence Shine-Dalgarno sont impliqués dans un appariement intramoléculaire. On peut donc se poser la question d'un éventuel rôle régulateur de la traduction des structures en épingle à cheveux observées.

1.2.7.3- Expression de l'HPPO sous la dépendance du promoteur *tac*

La surexpression de l'HPPO est intéressante pour définir les caractéristiques cinétiques, pour permettre la production d'anticorps, mais aussi en vu de l'analyse structurale. Le gène est cloné dans un vecteur pKK223-3 en deux étapes. Le gène, amplifié par PCR dans les conditions définies pour l'identification du gène *hppO* et en utilisant les amorces HPP-N-sens (CATGACTTCA CTTACAGTGT CC) et HPP-C-term (CAAACTGAGT AGCAGCTCAG G), est cloné dans le vecteur pGEMT-easy. On sélectionne le clone présentant le gène *hppO* en antisens du promoteur *lac*. On le digère alors par *Eco* RI. Ce faisant on récupère le gène *hppO* que l'on insert dans le vecteur pKK223-3 digéré par *Eco* RI. Le clone pKK3-2, présentant le gène *hppO* sous le contrôle du promoteur *tac*, est retenu. Lorsque l'on induit l'expression du clone pKK3-2 par l'ajout d'IPTG, on peut détecter une activité HPP oxydase. Cependant la protéine surexprimée (57,4 kDa) n'est pas décelable dans un extrait brut séparé sur gel acrylamide dénaturant. Il reste donc à améliorer le protocole de surexpression. Nous envisageons en outre de cloner l'HPPO en fusion avec une séquence Tag, (GST, poly-histidine, protéine A....) afin de faciliter la purification de la protéine surexprimée. Nous venons définitivement de montrer que le gène identifié codait une activité HPP oxydase. Cependant, en réalisant des recherches d'homologie au niveau des séquences protéiques (BLASTX ou BLASTP), nous observons que la protéine HPPO présente

jusqu'à 25% d'identité avec des acétolactate synthases (ALS), des pyruvate oxydases (POX) et des pyruvate deshydrogénases (PDH). Il est ainsi possible d'identifier des motifs très conservés tel ceux concernant la fixation du cofacteur TPP (Figure 5). En outre le profil d'hydrophobicité de l'HPPO est très proche de celui obtenu pour des ALS (non montré). Afin d'être sûr que le gène identifié code réellement l'HPPO et non pas une ALS, une POX ou une PDH ayant une activité annexe de type HPP oxydase, nous décidons de tester l'HPPO pour une éventuelle activité annexe.

1.2.8- HPPO versus ALS

Les recherches d'homologies protéique montrent que l'HPPO présente jusqu'à 25% d'identité avec des ALS. Ce résultat, bien que surprenant au premier abord, présente une certaine logique. En effet ces deux enzymes utilisent le FAD et le TPP comme cofacteurs réactionnels. Elles réalisent toutes deux une décarboxylation. Par ailleurs, l'un des substrats de l'ALS est le pyruvate, or notre substrat un pyruvate β substitué : l'hydroxyphénylpyruvate. Il est donc possible que la structure du site actif soit voisine et que par conséquence ces protéines partagent des activités enzymatiques communes. Nous avons utilisé la grande sous-unité recombinante et purifiée des ALS d'*Arabidopsis thaliana* (Chang & Duggleby, 1997) et de *E. coli* (Hill & Duggleby, 1998) pour servir de contrôle positif dans nos expériences réalisées pour rechercher une activité ALS chez l'HPPO. Les résultats obtenus montrent que l'HPPO ne présente pas d'activité ALS. Nous montrons aussi à cette occasion que les deux ALS testées n'ont pas d'activité HPP oxydase. Enfin nous observons que l'HPPO n'est pas inhibé par 115 ppm d'imazapyr (inhibiteur d'ALS, Cyanamid). Ces résultats montrent que bien qu'en dépit de points communs (séquence protéique et hydrophobicité) les ALS et l'HPPO sont des enzymes bien distinctes, n'ayant pas d'activités enzymatiques secondaires.

25 Exemple 2 IDENTIFICATION DES GENES CODANT LA 4-HPA 1-HYDROXYLASE

La 4-HPA 1-hydroxylase (HPAH) convertit le 4-HPA en HGA par une réaction d'hydroxylation accompagnée par un déplacement de la chaîne acétyle. Son activité a été caractérisée sur extraits bruts de *Rhodococcus erythropolis* S1 (Suemori *et al.*, 1995) ou sur extrait partiellement purifiés de *P. acidovorans* (Hareland, 1975). Elle a été purifiée par Suemori *et al.* (1996) cependant les séquences protéique et génétique ne sont pas publiées. Afin de pouvoir introduire cette activité enzymatique dans la plante, il est nécessaire d'identifier le gène.

Différentes approches sont envisageables: (1) la complémentation phénotypique et/ou fonctionnelle en utilisant une banque génomique, (2) la mutagenèse insertionnelle et donc l'identification du gène par la perte de l'activité enzymatique, (3) la purification de la protéine pour remonter à la séquence nucléique. Nous avons choisi de développer ces trois approches avec *Pseudomonas acidovorans* car il y a de nombreux outils de biologie moléculaire dont l'efficacité a été démontrée sur différentes espèces et souches de *Pseudomonas*. A titre d'exemples nous pouvons citer le transposon mini-Tn5 (De Lorenzo *et al.*, 1990), les vecteurs large spectre d'hôte tels pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994, 1995; D'Souza *et al.*, 2000), les techniques de transfert par conjugaison. Le transposon mini-Tn5 peut être utilisé soit pour perturber un gène (de Lorenzo *et al.*, 1990; Fedi *et al.*, 1996; Campos-Garcia *et al.*, 2000) soit pour introduire un gène dans le génome bactérien (Prieto *et al.*, 1999). Nous avons commencé par l'approche par la complémentation phénotypique car c'est ce qui paraissait le plus rapide et le plus simple. Cette approche a été suivie par les deux autres simultanément. Cependant, nous n'aborderons pas ici l'approche par mutagenèse insertionnelle, cette voie n'ayant pas été exploitée par la suite.

II.1- Matériels et Méthodes

II.1.1- Construction d'une banque génomique de *P. acidovorans* dans *E. coli*

Pour construire la banque nous utilisons le cosmide pLAFR5 et l'ADN génomique de *P. acidovorans*. Nous utilisons la souche hôte *E. coli* HB101.

II.1.2- Purification de la 4-HPA 1-hydroxylase

II.1.2.1- Test d'activité spectrophotométrique

Dans la réaction catalysée par la 4-HPA 1-hydroxylase, décrite par Hareland *et al.* (1975), il y a consommation d'oxygène moléculaire et de NADH, H⁺. Nous avons choisi de mesurer l'activité enzymatique en suivant l'oxydation du NADH, H⁺ en NAD⁺. Le milieu réactionnel comprend: NADH, H⁺ 300 µM; FAD 6,7 µM; KPi 100 mM; DTT 1 mM; 10 à 50 µg de protéines. La réaction est déclenchée par l'ajout du substrat: 4-HPA 1 mM. La réaction est suivie à 340 nm ou à 292 nm pendant 2 à 10 min. En effet, la consommation du NADH, H⁺ se traduit par une diminution de l'absorbance à 340 nm tandis que la production d'homogentisate se traduit par une augmentation de l'absorbance à 292 nm. Le test spectrophotométrique est très rapide, il est utilisé en routine pour suivre l'élution des protéines lors des étapes de purification.

II.1.2.1- Test d'activité HPLC

L'analyse des réactions enzymatiques par HPLC permet de confirmer la production d'HGA (temps de rétention, spectre UV). Le test enzymatique est réalisé dans les mêmes conditions que ci-dessus. Cependant la réaction est arrêtée par ajout d'un tiers de volume d'acide perchlorique 20%. Les réactions sont alors analysées par HPLC en élution isocratique avec 90% de phase A et 10 % de phase B ou 92% de phase A et 8% de phase B. La phase A est de l'eau milli Q contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) et la phase B correspond à de l'acétonitrile. Dans l'élution en isocratique 90% - 10%, l'HGA est élué en 1,2 min alors qu'en système isocratique 92% - 8% il est élué en 1,4 min. L'élution est enregistrée généralement à 230 nm. Van den Tweel *et al.* (1986) ont utilisé le 2,2'-bipyridyl (inhibiteur de protéine à fer non hémique) pour inhiber l'homogentisate dioxygénase et ainsi permettre l'accumulation de l'HGA. Pour cette raison, nous ajoutons dans certains milieu réactionnel 2 mM de 2,2'-bipyridyl. Dans ces conditions chromatographiques, il est possible d'identifier le 4-HPA et l'HGA. La chaîne HPLC est constituée d'une HPLC Alliance 2690 (Waters) et d'un détecteur à barette diode 996(Waters).

II.1.2.3- Purification de la protéine HPAH

Pseudomonas acidovorans est cultivé 48 heures sur milieu M63 contenant du 4-HPA comme seule source de carbone, à 29°C, 220 rpm. Les bactéries sont centrifugées à 3 000 g pendant 15 min à 6°C (Beckmann J2/21 M/E centrifuge). Le culot bactérien est repris dans le tampon de sonication (KPi 0,1 M pH 7,2; MgSO₄ 1mM; DTT 1mM; benzamidine hydrochloride 1 mM; acide caproïque 5 mM). La benzamidine hydrochloride et l'acide caproïque sont des inhibiteurs de protéases. La sonication est réalisée pendant 9 minutes en sonicant toutes les quarante secondes pendant vingt secondes à la puissance 5 (Vibra Cell, Sonic Materials INC., Connecticut, USA). Durant la sonication, l'échantillon est maintenu à la température de la glace fondante. L'extrait soniqué est centrifugé à 15 000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant récupéré est précipité avec 1 % de sulfate de streptomycine. Le précipité est éliminé par centrifugation à 15 000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est dessalé sur colonne PD10 (Pharmacia) puis chargé sur colonne DEAE/EMD 650 S équilibrée en tampon A (KPi 20 mM pH 7,2, glycérol 10 %, MgSO₄ 1 mM, DTT 1 mM). L'élution se fait en utilisant un tampon B (tampon A; KCl 1 M; 100 µM FAD). L'activité 4-HPA 1-hydroxylase est éluée pour une concentration en KCl voisine de 150 mM. Les fractions

actives, concentrées sur membrane UVIKON 10 kDa puis dessalées sur colonne PD10, sont alors déposées sur une colonne d'affinité Red (Red 120 Agarose type 3000 CL, SIGMA Ref R-0503) équilibrée en tampon A (ci dessus). L'élution est réalisée en deux étapes. La première est un lavage de la colonne Red en utilisant le tampon A enrichi avec du FAD 50 μ M final. La deuxième permet l'élution de la protéine; pour cela le tampon A est enrichi en FAD (3 mM) et en NADH, H⁺ (10 mM). Les fractions, contenant la protéine d'intérêt, sont rassemblées, concentrées et congelées à -80°C.

II.1.3- Microséquençage protéique de l'extrémité N-terminale et de peptides internes

Le même protocole que celui décrit dans le cas de l'HPP oxydase a été utilisé pour réaliser le séquençage de la protéine purifiée. Cependant, pour produire les peptides internes, la protéine a été digérée à la trypsine au lieu de l'endopeptidase Lys-C. La trypsine coupe après les arginines et les lysines. La digestion par la trypsine conduit généralement à l'obtention de fragments plus petits que ceux obtenus lors d'une digestion par l'endopeptidase Lys-C. Afin de pouvoir séquencer avec précision les peptides récupérés, il est parfois nécessaire de repurifier par HPLC les peptides récupérés.

II.1.4- Identification d'une partie du gène codant l'HPAH par PCR dégénérée

Pour la synthèse des amorces dégénérées on utilise le code de dégénérescence présenté en page 43. La PCR est réalisée dans un volume final de 50 μ L, dans des tubes de 200 μ L. La solution réactionnelle contient le tampon Perkin Elmer, 250 μ M dNTP, 50 ng d'ADN génomique de *P. acidovorans*, 2 unités enzymatiques d'AmpliTaq (Perkin Elmer). La réaction est réalisée en utilisant un thermocycleur "Hybaid Touchdown": 3 min à 94°C, puis quarante cinq cycles : 30 sec à 94°C, 1 min à 50°C, 1 min 30 sec à 72°C, suivi d'une élongation finale de 5 min à 72°C avant de revenir à 4°C. La PCR est évaluée après dépôt de 10 μ L sur gel 1% agarose. Dans ces conditions une bande de 536 pb est identifiée.

II.1.5- Criblage de la banque cosmidique de *P. acidovorans*

Étalement de la banque cosmidique sur milieu LBT¹⁵ et croissance pendant 16 h00 à 37°C. Les boîtes sont alors transférées à 4°C. Au bout d'une heure, les colonies sont transférées sur membranes Hybond N (Amersham) selon la méthode de Grunstein & Hogness (1975). Les membranes sont hybridées en utilisant le fragment PCR de 536 pb

précédemment identifié et purifié. La détection est réalisée en ^{32}P . La sonde est marquée en utilisant le kit « DNA Ready to Go » (Pharmacia). La pré-hybridation, l'hybridation et les lavages sont réalisés en ampoules. Les membranes sont pré-hydrénées dans une solution composée de SSC 5x, Denhardt 6%, SDS 0,5% pendant 4 heures à 68°C.

5 L'hybridation est réalisée pendant 16 heures à 68°C. Les lavages sont effectués à 65°C en SSC 2x, SDS 0,1%. Les membranes sont révélées en exposant des films Kodak ou Amersham.

II.1.6- Milieux de croissance de *P. putida*

Pseudomonas putida est cultivé sur milieu riche de Luria-Bertani (LB) ou 2YT contenant 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicine. En fonction des besoins d'autres antibiotiques sont ajoutés (exemple : tétracycline à 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Le milieu minimum M63 contenant 1,5 g.L^{-1} de 4-HPA comme seule source de carbone est utilisé pour tester la complémentation fonctionnelle. Dans ce cas les antibiotiques sont omis. Toutes les cultures sont réalisées à 29°C.

15 II.1.7- Transformation de *P. putida* par électroporation

1 litre de milieu LB Rifampicine (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) est inoculé avec une culture de *P. putida* mise en croissance à 29°C pendant environ 16 heures en agitation à 180 rpm. Lorsque la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ est voisine de 1,2, les cellules sont collectées par centrifugation pendant 15 min à 3 000 g, 4°C. Le milieu de culture est éliminé et les cellules sont reprises avec 400 mL de glycérol 10% à 4°C. Les cellules sont centrifugées une nouvelle fois à 3000 g, 20 min, 4°C. Deux nouvelles étapes de lavage sont effectuées avec respectivement 200 puis 100 mL de glycérol 10%, 4°C. Enfin, les bactéries sont reprises par 3 à 10 mL de glycérol 10% puis réparties en aliquotes de 100 μL immédiatement congelées dans l'azote liquide. Les bactéries ainsi préparées se conservent au moins six mois à - 80°C. Lors de la préparation, on observe une perte de bactéries due à la lyse. L'ADN cosmétique (Tet^R) est introduit par électroporation dans les *P. putida* (Rif^R). L'électroporation (Bio-Rad Gene PulserTM) de 80 ng d'ADN cosmétique dans 100 μL *P. putida* électrocompétentes se fait en cuvette d'électroporation de 2 mm sous une tension de 0,9 volt avec une résistance de l'électroporateur de 200 Ω . Dans ces conditions, la constante de temps τ est d'environ 4,5 msec. Après le choc électrique, les cellules sont reprises avec 900 μL de LB et mise en culture pendant 1h30 à 29°C, 180 rpm. Les *P. putida* transformées sont sélectionnées sur milieu gélosé LB Rif¹⁰⁰ Tet¹⁵.

II.1.8- Modification du vecteur large spectre d'hôte pBBR1MCS-Gm^R

Nous avons utilisé les vecteurs à large spectre d'hôte à Gram négatif de la série des pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994, 1995). Ces plasmides, qui possèdent une origine de répllication de *Bordetella bronchiseptica*, se répliquent à environ 20-30 copies par cellule chez *E. coli*. Ils contiennent deux sites *Not* I. Afin de faciliter les clonages ultérieurs on supprime le site *Not* I présent hors du multi-site de clonage (MCS) sur le plasmide pBBR1MCS-Gm^R. Pour cela, le plasmide est coupé par *Sfi* I (50°C) puis traité à la T4 DNA polymérase afin d'obtenir des bouts francs. Le plasmide est reliqué sur lui même (T4 DNA Ligase - New England Biolabs). Après ligation (16 heures, 16°C), une digestion par *Sfi* I est réalisée afin d'éliminer les éventuels plasmides "sauvages"; puis on électropore *E. coli* DH5 α . L'ADN plasmidique est isolé des clones sélectionnés sur milieu LB Gm²⁰. Les ADN plasmidiques sont caractérisés par deux digestions: *Not* I et *Not* I/*Bgl* II. Un clone est retenu: pBBR1MCS-Gm-Not-U.

II.1.9- Sous-clonage du Ccos8 dans pBBR1MCS-Gm-U

Le cosmide Ccos8 est restreint par *Not* I puis déposé sur gel agarose. Après migration, 6 bandes d'ADN sont visualisées : 1,7 - 3 - 4 - 5 - 8 - 10 kbp. Les bandes sont purifiées par Quiaex II. Par ailleurs, pBBR1MCS-Gm-Not-U est restreint par *Not* I, déphosphorylé en utilisant la phosphatase alcaline de crevette (S.A.P.; shrimp alkaline phosphatase). Les différentes bandes sont alors liées (T4 DNA ligase, 16 heures, 16°C) dans le vecteur en utilisant des rapports "insert/vecteur" variables. Les produits de ligation sont transformés dans *E. coli* DH5 α .

II.1.10- Conjugaison tri-parentale entre *E. coli* et *P. putida*

Afin de transférer les différents sous-clones de Ccos8 (Gm^R) de *E. coli* DH5 α vers *P. putida* (Rif^R), on opère par conjugaison tri-parentale sur filtre en utilisant le protocole décrit par De Lorenzo *et al.* (1990). Les bactéries récupérées sont étalées sur LB Rif¹⁰⁰Gm²⁰ et sur M63 ayant le 4-HPA comme seule source de carbone.

II.1.11- Elimination du plasmide p5kbC

Pour éliminer rapidement le plasmide p5kbC de *P. putida*, nous utilisons la stratégie des origines de répllication incompatibles et nous forçons la perte du p5kbC à l'aide d'antibiotiques. On transforme *P. putida* (Rif¹⁰⁰) complétement par le plasmide p5kbC (Gm^R) avec pBBR1MCS Kn^R. Les clones obtenus (Rif¹⁰⁰ Gm^R Kn^R) sont vérifiés pour leur activité de complémentation. Les clones sont alors cultivés sur deux milieux : LB Rif¹⁰⁰ Kn¹⁵⁰ Gm²⁰ et LB Rif¹⁰⁰ Kn¹⁵⁰. Ce faisant nous maintenons la pression de

sélection pour p5kbC et pBBR1MCS Kn^R ou bien seulement pour pBBR1MCS Kn^R. Les croissances sont réalisées à 29°C. Le repiquage est réalisé tous les trois jours. Au huitième repiquage, les colonies sont repiquées sur 4 milieux différents (M63, M63 + 4-HPA, LB Rif^{r100} Kn¹⁵⁰ Gm²⁰ et LB Rif^{r100} Kn¹⁵⁰) quelle que soit la boîte d'origine. L'état de croissance est alors relevé au bout de 2 et 7 jours.

II.1.12- Identification des protéines participant à l'activité enzymatique.

II.1.12.1- Préparation d'extraits bruts de *P. putida*

Deux clones *P. putida* sont cultivés sur LB Gm²⁰ pendant 24 heures. Le premier comporte le plasmide pBBR1MCS-Gm-Not-U tandis que le second contient le plasmide de complémentation p5kbC. Après sonication dans un tampon (KPi 0.1 M; MgSO₄ 1mM; DTT 1mM; benzamidine hydrochloride 1 mM; acide caproïque 5 mM), puis centrifugation à 20 000 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant est testé pour son activité 4-HPA 1-hydroxylase en utilisant les deux méthodes de mesure de l'activité enzymatique. Les extraits bruts sont, en outre, analysés par SDS-PAGE à 10%.

II.1.12.2- Transfert sur membrane, Séquençage N-terminal

Le séquençage est réalisé comme en exemple I.

II.1.12.3- Gel Filtration S75

L'éluat (5 mL) est concentrée d'un facteur 10 en utilisant un MacrosepTM 10 K (Pall Filtron) pendant deux heures à 4°C. Les 500 µL concentrés sont injectés sur une colonne de gel filtration SuperdexTM 75 prep grade (HiLoad 16/60, Pharmacia) préalablement équilibrée avec 700 mL de tampon (KPi 0,02 M pH 7,2; glycérol 10%; MgSO₄ 1 mM; DTT 1 mM; 4°C) à un débit de 0,7 mL.min⁻¹. La chromatographie est réalisée à 4°C avec un débit de 1 mL.min⁻¹. Les fractions sont collectées toutes les minutes et conservées à 4°C.

II.1.12.4- Construction de pBBR1MCS FT12Δ1

Pour construire le plasmide pBBR1MCS FT12Δ1 on utilise une stratégie de clonage en deux étapes. Le plasmide p5kbC est digéré par *Nsi* I et *Not* I. L'insert obtenu, codant les gènes 1, *hpaH* et 3, est alors cloné dans pBBR1MCS-Gm-Not-U digéré *Pst* I et *Not* I. Le clone résultant, dénommé pBBR1MCS FT12, est restreint par *Hind* III et *Asc* I, puis rendu bout-francs et enfin reliqué. Ce faisant, les gènes 1 et 3 sont détruits et le gène *hpaH* se trouve sous la dépendance du promoteur *lac* du vecteur originel. Nous obtenons ainsi le plasmide pBBR1MCS FT12Δ1 (Figure 6).

II.1.12.5- Construction de pL1lac2

Le laboratoire possède un plasmide dénommé "Clone L". Cette construction correspond au clonage du promoteur et du gène de l'HPPD de *P. fluorescens* dans le vecteur pBBR1MCS-Kn^R. Le promoteur du gène HPPD est fonctionnel chez *P. putida* et chez *E. coli*. Le plasmide "Clone L" est digéré par *Bam* HI et *Hin* dIII ce qui permet de récupérer l'insert contenant le promoteur et le gène HPPD de *P. fluorescens*. Cet insert est alors ligué dans le vecteur pBBR1MCS-Gm^R digéré par *Bam* HI et *Hin* dIII. Le clone résultant est dénommé pBBRG-L-HPPD. Le plasmide obtenu, digéré par *Nco* I pour éliminer le gène codant l'HPPD, est ligué avec le gène *hpaC* amplifié par PCR et digéré par *Afl* III. La construction obtenue est appelée pBBRG-L-ORF1. Pour l'amplification du gène *hpaC* par PCR, on utilise des amorces qui permettent d'introduire un site *Afl* III en début et en fin de gène (le site *Afl* III est compatible avec le site *Not* I). Les amorces utilisées sont : en 5' du gène : GCAGGATGCA CATGTCCACC AAGAC et en 3' du gène : CGGACGCCGA CATGTATCAG CCTTC. La PCR est réalisée en utilisant 1 unité de KlenTaq polymérase (Sigma), 250 µM de dNTP, 200 nM de chaque amorce et 50 ng du plasmide p5kbC. Le programme de PCR est défini comme suit sur Perkin Elmer 9600 : 3 min à 95°C ; puis 20 cycles : 94°C pendant 1 min, 60°C pendant 30 sec, 68°C pendant 3 min ; enfin une dernière étape de 10 min à 68°C est réalisée. Le plasmide pBBR1MCS FT12Δ1 précédemment obtenu est restreint par *Ssp* I et *Not* I. Le site *Not* I est rendu franc par traitement avec la *Pfu*. Le fragment récupéré (2468 pb), contenant le gène *hpaH* sous la dépendance du promoteur *lac*, est ligué dans pBBRG-L-ORF1 digéré par *Ssp* I. Le clone présentant les gènes *hpaC* et *hpaH* en antisens est retenu, il est nommé pL1lac2. Tous ces clonages sont réalisés dans *E. coli* DH5α.

II.2- Résultats

Différentes approches sont envisageables pour identifier le gène codant l'activité 4-HPA 1-hydroxylase de *P. acidovorans*. Nous décidons dans un premier temps d'utiliser une approche par coloration phénotypique. Cette approche paraît simple et rapide. En effet, nous possédons au laboratoire un outil de criblage phénotypique pour détecter la production d'HGA. Or l'enzyme que nous recherchons convertit le 4-HPA en HGA.

II.2.1- Approche par coloration phénotypique

Nous avons observé au laboratoire qu'*E. coli* K12 ne peut pas croître en utilisant la tyrosine ou le 4-HPA comme seule source de carbone. Nous savons d'autre part qu'*E.*

coli K12 possède l'activité tyrosine aminotransférase qui permet la synthèse de tyrosine à partir d'HPP. Cette activité enzymatique est réversible, la cellule peut donc produire de l'HPP à partir de la tyrosine. Si le milieu riche de culture est enrichi en tyrosine (1 g.L⁻¹), la tyrosine est importée dans les bactéries qui l'accumulent puis la transforment en HPP, selon la constante d'équilibre de la réaction de conversion entre HPP et tyrosine. Au laboratoire, nous avons déjà observé que si nous introduisons l'HPPD de *P. fluorescens* dans *E. coli* K12 alors l'HPP produit lors de la désamination de la tyrosine, est transformé en homogentisate (HGA). La réaction catalysée par l'HPPD étant irréversible, l'HGA s'accumule dans la cellule où il s'oxyde puis polymérise spontanément pour former un pigment ochronotique présentant une coloration brune. Nous avons donc là un moyen de détecter la production d'HGA. La 4-HPA 1-hydroxylase recherchée convertit le 4-HPA en HGA. On étale donc les *E. coli* HB101 contenant la banque génomique de *Pseudomonas acidovorans* sur milieu gélosé 2YT enrichi en 4-HPA. Après deux jours, deux colonies brunissent : elles produisent donc de l'homogentisate. Cependant, les activités enzymatiques réalisées sur les extraits bruts de ces deux clones révèlent une activité enzymatique de type HPPD alors que l'activité 4-HPA 1-hydroxylase recherchée est discrète, voire inexistante. A priori cette approche a permis de sélectionner les clones dont le cosmide contient le gène codant une HPPD de *P. acidovorans* et non pas la 4-HPA 1-hydroxylase. Lors de l'étude préliminaire *in vitro* sur les extraits bruts de *P. acidovorans*, l'activité HPPD n'a pas été identifiée. On peut supposer que l'activité HPPD de *P. acidovorans* s'exprimerait lorsque la bactérie est cultivée sur milieu riche tandis que l'activité 4-HPA 1-hydroxylase s'exprimerait lorsque le 4-HPA est la seule source de carbone. Cette approche ne permettant pas l'identification de la 4-HPA 1-hydroxylase nous décidons de purifier l'enzyme. Une fois la protéine identifiée, il sera possible de remonter au gène correspondant.

II.2.2- Purification de la 4-HPA 1-hydroxylase

Pour suivre la purification de la protéine, nous utilisons le dosage de son activité NADH,H⁺ oxydase dépendante du 4-HPA. Nous purifions ainsi la protéine à quasi homogénéité en appliquant le protocole de purification décrit précédemment. Le facteur d'enrichissement de l'activité spécifique NADH,H⁺ oxydase est généralement compris entre 50 et 100 selon les préparations. Sur SDS-PAGE, la protéine présente un poids moléculaire apparent de 60 kDa. En fait, nous observons que l'activité NADH,H⁺ oxydase et la production d'HGA sont bien visibles en sortie de DEAE/EMD 650S. Par

contre en sortie de colonne d'affinité, la production d'HGA est très difficilement décelable; l'activité NADH, H^+ oxydase reste cependant dépendante de l'ajout du 4-HPA dans le milieu réactionnel. Si nous partons de l'hypothèse que l'enzyme est monomérique, la perte de l'activité catalytique permettant la production d'HGA peut s'expliquer en supposant qu'une partie de la protéine a été endommagée (ex : perte d'un cofacteur fortement lié) lors de son passage sur la colonne Red. Le site catalysant l'oxydation du NADH, H^+ ne serait pas touché. On peut aussi supposer que l'enzyme recherchée est un hétérodimère. La perte de l'activité catalytique s'expliquerait alors par la perte du monomère responsable de la production d'HGA. Dans la littérature de nombreuses monooxygénases hétérodimériques à flavine ont été identifiées, ayant toutes un substrat aromatique, dans des espèces bactériennes variées (Adachi *et al.*, 1964; Arunachalam *et al.*, 1992, 1994; Prieto *et al.*, 1993; Prieto & Garcia, 1994; Arunachalam & Massey, 1994; Takizawa *et al.*, 1995; Xun, 1996; Xun & Sandvik, 2000). Cependant, il existe deux hypothèses pour expliquer le fonctionnement de ces enzymes hétérodimériques:

(1) Arunachalam *et al.* (1992, 1994) proposent que la 4-hydroxyphénylacétate 3-hydroxylase de *P. putida* soit constituée d'une flavoprotéine homodimérique de 65 kDa ainsi que d'une protéine de couplage de 38,5 kDa. La flavoprotéine seule est capable d'oxyder le NADH, H^+ indépendamment de la présence de 4-HPA. Cette oxydation du NADH, H^+ permet de renouveler le "pool" de NAD^+ , mais produit de l' H_2O_2 dans des proportions stoechiométriques. Si la protéine de couplage est ajoutée, le complexe protéique devient capable d'hydroxyler le 4-HPA en acide 3,4-dihydroxyphénylacétique. Ainsi, l'oxydation du NADH, H^+ n'est pas gaspillée et permet la synthèse d'un métabolite. La protéine de couplage seule n'a pas d'activité enzymatique.

(2) Prieto *et al.* (1993, 1994) et Xun & Sandvik (2000) suggèrent que la 4-HPA 3-hydroxylase de *E. coli* W (ATCC 11105) soit considérée comme un nouveau membre des monooxygénases à flavine à deux composantes mobiles (TC-FDM). Les deux composantes seraient d'une part la 4-hydroxyphénylacétate 3-hydroxylase, une enzyme monomérique de 59 kDa codée par le gène *HpaB*, et d'autre part une flavine:NADH oxydoréductase monomérique de 19 kDa, codée par le gène *HpaC*. Dans ce cas, le FAD est réduit au dépend du NADH, H^+ par la flavine:NADH, H^+ oxydoréductase. Le $FADH_2$ est alors utilisé par l'oxygénase pour permettre l'oxydation du substrat en utilisant l'oxygène moléculaire.

L'enzyme que nous avons purifiée oxyde fortement le NADH, H^+ mais produit très peu d'homogénisate. En outre l'oxydation du NADH, H^+ est dépendante de l'ajout de 4-HPA. Ceci suggère que nous possédons une enzyme du type de celle décrite par Prieto *et al.* Nous considérons donc que l'enzyme purifiée est la 4-HPA 1-hydroxylase (HPAH) recherchée. Il est possible, que par la suite, il soit nécessaire d'identifier une protéine de couplage pour optimiser l'activité enzymatique. L'approche biochimique peut donc se poursuivre avec la protéine purifiée.

II.2.3- Obtention des peptides internes et de la séquence N-terminale.

La protéine purifiée est envoyée à l'Institut Pasteur pour être micro-séquencée. C'est ainsi que l'on obtient la séquence N-terminale SHPAISLQAL RGS GADIQSI HIPYER et six peptides internes nommés respectivement peptides N° 11C, 12D, 20A, 22B, 23, 24 en fonction de leur ordre de sortie de colonne: ATDFITPK, LGVGQPMVDK, VVFAGDSAAG VSPFX, VTALPQAEG AL, IDFQLGWDAD PEEEEK, LSVPATLHGS ALNTPD TDTF. Sur la séquence N-terminale, on ne retrouve pas l'acide aminé (méthionine ou valine) correspondant normalement au codon d'initiation du gène (ATG ou GTG). Les analyses d'homologies dans les bases protéiques en utilisant l'algorithme BLASTP ne permettent pas d'identifier de protéines homologues. Sur la base des séquences protéiques obtenues, nous faisons synthétiser les oligonucléotides dégénérés correspondants. Ceux-ci sont utilisés dans des réactions de PCR afin d'identifier une partie du gène codant la protéine HPAH purifiée et partiellement séquencée.

II.2.4- Obtention du fragment PCR

L'amplification par PCR d'une portion (536 pb) du gène codant la 4-HPA 1-hydroxylase est obtenue en utilisant les amorces dégénérées Hy4R: TCYTCNGGRT CNGCRTCCCA et Hy5F: GGNGTNGGNC ARCCNATGGT qui codent respectivement les peptides 23 et 12D. Ces amorces ont une température d'hybridation de $55,4^\circ\text{C}$ et présentent une dégénérescence de 128 et 512 respectivement. La séquence amplifiée est clonée dans le vecteur pGEMT-easy puis elle est séquencée. L'analyse de la séquence obtenue permet de retrouver, outre les séquences codant les peptides Hy4R et Hy5F, la séquence nucléique codant le peptide interne 22B. Ce dernier élément permet de confirmer que nous avons bien amplifié une partie du gène codant la protéine HPAH purifiée. A ce stade, les recherches d'homologies dans les bases protéiques, en utilisant l'algorithme BLASTX, font ressortir quelques faibles homologies avec des

hydroxylases, des oxydases et des monooxygénases. En utilisant la séquence de 536 pb amplifiée par PCR, nous allons pouvoir cribler une banque cosmidique de *P. acidovorans* afin de rechercher le cosmide contenant le gène complet.

II.2.5- Criblage de la banque cosmidique de *P. acidovorans*

5 Le criblage de la banque cosmidique, en utilisant comme sonde la séquence obtenue ci-dessus, a permis d'identifier 4 groupes de cosmides considérés comme différents sur la base de leurs profils de restriction et d'hybridation après transfert par la technique de Southern. Les cosmides N° 1, 2, 6 forment le premier groupe, les cosmides N° 3, 7, 9 forment le second tandis que les cosmides N°5 et 8 forment le troisième. Le
10 dernier groupe est représenté par le cosmide N°4. Les résultats d'hybridation suggèrent en outre que le gène *hpaH* recherché est présent en un seul exemplaire dans le génome de *Pseudomonas acidovorans*. Nous avons identifié des cosmides comportant au moins une partie du gène codant la protéine HPAH purifiée. Entre temps, nous avons observé
15 l'HGA comme seule source de carbone. Nous possédons donc là un excellent crible pour la complémentation fonctionnelle ; nous pourrions ainsi définir lequel de ces cosmides comporte le gène fonctionnel codant l'activité 4-HPA 1-hydroxylase.

II.2.6- Complémentation fonctionnelle avec les cosmides

Les neuf cosmides précédemment identifiés sont introduits dans *P. putida* par
20 électroporation. Les clones obtenus sont alors repiqués sur milieu M63 contenant du 4-HPA comme seule source de carbone. Au bout de 7-8 jours seules les bactéries possédant le cosmide N°8 ont réussi à croître. C'est à dire que seul le cosmide N°8 contient toute l'information exprimable permettant la conversion du 4-HPA en HGA utilisable par *P. putida*. Le cosmide est alors dénommé Ccos8. La transformation avec
25 l'ensemble des cosmides est répétée. C'est toujours le cosmide 8 qui permet la complémentation après un certain délai (6-10 jours). Afin de pouvoir avancer dans notre approche de détermination du fragment d'ADN minimum exprimant l'activité 4-HPA 1-hydroxylase, il nous faut sous-cloner le Ccos8. La sélection du sous-clone intéressant se fera en utilisant le crible de la complémentation fonctionnelle.

30 II.2.7- Sous clonage par complémentation fonctionnelle

La digestion par *Not* I du cosmide permet d'obtenir 6 fragments d'ADN de taille comprise entre 1,7 et 10 kb. Ces fragments sont clonés dans pBBR1MCS-Gm-Not-U. Cinq sous-clones de Ccos8 sont obtenus. L'analyse par restriction montre que les

fragments de 4 et 10 kb ne sont pas sous clonés. En revanche, nous observons que la bande de 5 kb observée initialement était en fait une bande double de 5,1 et 5,2 kb. Ces clones sont passés, par conjugaison tri-parentale, de *E. coli* à *P. putida*. Au bout de 5 jours, seul *P. putida* contenant le sous-clone correspondant à la bande de 5,2 kb du cosmide Ccos8 a poussé sur M63 contenant le 4-HPA comme seule source de carbone. Nous venons donc d'identifier le fragment minimal comportant l'activité 4-HPA 1-hydroxylase. Les clones correspondants à la bande de 5,2 kb sont nommés 5kbC. Pour confirmer le résultat de la complémentation fonctionnelle, nous provoquons l'élimination du plasmide p5kbC en utilisant la stratégie des origines de répllication incompatibles et en forçant l'élimination du plasmide p5kbC par la pression de sélection des antibiotiques utilisés. Nous observons que *P. putida* perd la capacité à croître sur 4-HPA comme seule source de carbone lorsqu'il a perdu le plasmide p5kbC. Nous en concluons que l'activité enzymatique 4-HPA 1-hydroxylase est bien portée par le plasmide p5kbC. Nous pouvons donc faire séquencer l'insert de 5,2 kb, ce qui devrait nous permettre d'identifier le gène *hpaH* fonctionnel.

II.2.8- Analyse de la séquence de 5,2 kb

L'insert de 5,2 kb du plasmide p5kbC est séquencé. Une recherche d'homologie nucléaire (BLASTN) permet d'identifier ainsi trois parties dans l'insert. La première partie comprise entre les bases N° 1 et 1465 est parfaitement homologue d'une partie du plasmide Birmingham IncP-alpha. Il s'agit donc vraisemblablement d'une séquence issue de pLAFR5. Une seconde partie nucléaire comprise entre les bases N° 1466 et 1695 présente une homologie parfaite avec une partie du plasmide de clonage M13mp8/pUC8. Cette séquence fait donc encore partie du pLAFR-5 ; en effet le multi-site de clonage de pLAFR-5 provient de pUC8 (Keen *et al.*, 1988). Ainsi, les sites *Eco* RI et *Sma* I (Figure 7) en position respective 1689 et 1695 sont vraisemblablement les sites de clonage du pLAFR-5. La troisième partie, comprise entre les bases 1696 et 5264 (soit 3568 pb) ne présente pas d'homologies fortes. Cette partie d'ADN provient du génome de *P. acidovorans*. Lorsque la séquence de 5,2 kb est analysée en utilisant l'algorithme BLASTX, on identifie des protéines probables (Figure 7). Ainsi la protéine codée par le gène 1 présente de faibles homologies avec à des bêta-lactamases, des déshydrases et des cyclases. La protéine purifiée est codée par le gène 2 puisque l'on retrouve les séquences codant les peptides internes précédemment obtenus ; c'est donc vraisemblablement la 4-HPA 1-hydroxylase. Les alignements protéiques montrent que

cette protéine présente quelques homologues avec des oxygénases et des hydroxylases. La protéine potentiellement codée par le gène 3 ne présente pas d'homologies avec les bases de données. Enfin le gène 4 code vraisemblablement un régulateur d'opéron.

Faisons maintenant à une analyse plus fine du gène *hpaH*. D'après la séquence protéique N-terminale obtenue, le codon initiation ATG de la protéine 4-HPA 1-hydroxylase se trouve en fait 78 pb en aval d'un codon initiateur GTG en phase avec l'ATG. La séquence Shine-Dalgarno AGGA, permettant la fixation des ribosomes, est retrouvée en amont de l'ATG initiateur mais pas en amont du codon initiateur GTG ; ce qui confirme que la région codante commence au codon initiateur ATG. La portion comprise entre les codons GTG et ATG ne correspond donc vraisemblablement pas à une préprotéine. Ainsi défini, le gène *hpaH* est long de 1737 pb et se termine par le codon stop TGA. Le gène est constitué à 70,9 % de bases GC.

Maintenant que nous avons défini avec précision les limites du gène *hpaH*, analysons le produit de sa traduction : la protéine HPAH

II.2.9- Analyse de la protéine HPAH

La séquence *hpaH* est traduite en utilisant le système universel des codons. Nous obtenons ainsi une protéine de 563 acides aminés, ce qui représente un poids moléculaire de 62,2 kDa. Les recherches d'homologies protéiques (BLASTP) montre que l'HPAH présente environ 15 à 25 % d'identité essentiellement avec des protéines d'organismes à Gram positif codant pour des activités enzymatiques apparemment très différentes de celle recherchée. Ainsi on retrouve une oxygénase de *Streptomyces argillaceus*, la 3-(3-hydroxy-phényl)propionate hydroxylase (EC 1.14.13.-) d'*E. coli*, la 2,4-dihydroxybenzoate monooxygénase de *Sphingomonas sp.*, l'enzyme catalysant la 6-hydroxylation de la tétracycline chez *Streptomyces aureofaciens*, une oxygénase potentielle de *Streptomyces fradiae*. En fait, l'HPAH présente des homologues avec les protéines de la famille des phénol monooxygénases (*pheA*) et celles de la famille des 2,4-dichlorophénol hydroxylase (*tfdB*). L'alignement correspondant aux protéines précitées est réalisé en utilisant l'algorithme ClustalW (Figure 8). Il permet de mettre en évidence des boîtes très conservées. On relèvera entre autre trois motifs d'interaction avec le FAD. Le premier (GXGXXG) correspond au motif structural β - α - β qui permet l'interaction de la partie ADP du FAD avec la protéine. Le deuxième motif (A/C)DG est impliqué dans la fixation du FAD tandis que le troisième motif G (R) VXX (A) GD (A) XH permet l'interaction avec la partie flavine du FAD. Bien que

l'enzyme utilise du NADH, H^+ le site de fixation correspondant (GDH) n'est pas identifié. Cette absence de site de fixation au NADH, H^+ est une caractéristique souvent observée chez d'autres monooxygénases à FAD. Enfin, on observe un motif (DXXXLXWK LX XXXXXXXXXXXX LLXXYXXER) que l'on retrouve aussi chez d'autres hydroxylases (Ferrandez *et al.*, 1997), mais dont la signification n'est pas éclaircie. Bien que la 3-(3-hydroxyphényl)-propionate hydroxylase d'*E. coli* catalyse une réaction d'hydroxylation sur un substrat structuellement proche du 4-HPA, les informations acquises par ces analyses bioinformatiques ne permettent pas de s'assurer que nous avons bien identifié la 4-HPA 1-hydroxylase. La seule manière de le faire, c'est d'exprimer le gène *hpaH* et d'étudier son activité enzymatique.

II.2.10- Identité des protéines impliquées dans l'activité 4-HPA 1-hydroxylase

II.2.10.1- Expression du gène *hpaH* codant la 4-HPA 1-Hydroxylase

Afin de confirmer que le gène *hpaH* code l'activité 4-HPA 1-hydroxylase, il est nécessaire d'exprimer le gène. Pour ce faire, une stratégie de clonage en deux étapes est utilisée permettant d'éliminer les gènes N° 1 et 3 et de placer le gène *hpaH* sous la dépendance du promoteur *lac* du vecteur originel pBBR1MCS-Gm-Not-U. Le plasmide obtenu est dénommé pBBR1MCS FT12Δ1. Un extrait brut est réalisé à partir d'une culture sur milieu riche de *P. putida* transformée avec ce plasmide. La recherche d'activité par spectrophotométrie (à 340 et 292 nm) montre que le clone possède certes l'activité NADH, H^+ oxydase induite par l'ajout de 4-HPA, mais ne possède pas la capacité de synthèse de l'homogentisate à partir du 4-HPA. En revanche on observe l'apparition d'une molécule Z ayant un temps de rétention très proche ($t_r = 1,2$ minutes *versus* 1,4 minutes) mais un spectre UV très différent de celui de l'HGA. Nous posons l'hypothèse que l'HPAH oxyde le NADH, H^+ pour réduire son cofacteur FAD. La réoxydation du FAD se fait au détriment du 4-HPA puisque c'est l'ajout du 4-HPA qui initie la réaction. Le 4-HPA est donc converti en métabolite Z. Le spectre UV de ce métabolite suggère que le cycle n'est plus aromatique mais peut être cependant insaturé. Nous présentons en figure 2 une hypothèse structurale pour le métabolite Z. Cette expérience montre que le promoteur *lac* est fonctionnel chez *P. putida* en absence d'inducteur IPTG, ce qui suggère que le répresseur *lacI* est naturellement absent chez *P. putida*. Nous démontrons en outre que la protéine initialement purifiée (HPAH) est réellement une NADH, H^+ oxydase dépendante du 4-HPA qui convertit le 4-HPA en un métabolite Z. La HPAH ne produit pas d'HGA. Il est donc nécessaire d'identifier la ou

les protéines partenaires de cette NADH,H⁺ oxydase dépendante du 4-HPA et dont l'ajout permet de restorer l'activité 4-HPA 1-hydroxylase.

II.2.10.2- Identification de la protéine HPAC par gel filtration

Nous avons vu que l'activité 4-HPA 1-hydroxylase disparaissait lors de la purification de l'HPAH sur colonne d'affinité Red. Nous posons donc l'hypothèse que la ou les protéines partenaires de la NADH,H⁺ oxydase dépendante du 4-HPA n'ont pas été retenus par la résine d'affinité Red 120 agarose et sont donc récupérées dans le "flow-through". Nous décidons donc de purifier le "flow-through" et de rechercher la ou les protéines qui ajoutées à la HPAH permettent de restorer l'activité 4-HPA 1-hydroxylase. Pour ce faire, le "flow-through" est concentrée par ultrafiltration (MacrosepTM 10K) puis chargée sur une colonne de gel filtration S75. Un débit de 1 mL.min⁻¹ est appliqué et les fractions de 1 mL sont collectées. On réalise alors des réactions enzymatiques mettant en présence 50 µL de chaque fraction et 10 µL d'HPAH préalablement purifié sur colonne Red, dans les conditions réactionnelles normales. Les réactions stoppées sont alors analysées par HPLC. On observe que les fractions 90 à 108, lorsque additionnées à de la protéine HPAH, permettent de produire davantage du métabolite Z. La production du métabolite Z est détectée dans ces même fractions en l'absence d'apport d'HPAH. Par ailleurs, sur les gels d'acrylamide correspondants à ces fractions, nous observons une protéine de poids moléculaire équivalent à HPAH. Nous concluons que le "flow-through" contenait encore un peu de protéine HPAH. Lorsque les fractions 109 à 143 sont additionnées à de la protéine HPAH, on observe la production d'HGA. Plus la production d'HGA est forte, plus celle du métabolite Z est faible. Le maximum de production d'homogentisate est obtenu pour les fractions 116 à 128. Le dépôt sur gel acrylamide de des fractions comprises entre 95 et 145 montre qu'une protéine est fortement enrichie dans les fractions 109 à 143, c'est à dire que le profil chromatographique de cette protéine coïncide avec le profil de production d'HGA. Nous décidons de dénommer cette protéine HPAC. La protéine HPAC est excisée du gel puis microséquencée en N-terminal. La séquence obtenue, MTTKTFA, montre que cette protéine est codée par le gène 1 (Figure 7) que nous dénommons dorénavant *hpaC*. Cette expérience montre que l'activité 4-HPA 1-hydroxylase implique deux protéines, l'HPAH et l'HPAC. Cependant, nous n'avons pas défini la nature de l'interaction entre ces deux protéines : (1) HPAH et HPAC sont elles toutes deux des enzymes ou bien (2) est-ce l'HPAH qui possède une activité enzymatique

modifiable en fonction de l'interaction avec l'HPAC.

II.2.10.3- Nature des interactions entre HPAH et HPAC

L'expérience précédente démontre que les protéines HPAH et HPAC sont nécessaires pour reconstituer l'activité 4-HPA 1-hydroxylase. Deux hypothèses pour expliquer le rôle respectif de ces protéines sont posées. Dans ce paragraphe nous présentons les résultats qui suggèrent que l'HPAC est une enzyme à part entière. Les fractions 100, 101 et 102 de la gel filtration sont rassemblés. Elles contiennent la HPAH c'est à dire l'activité NADH,H⁺ oxydase qui permet de produire le métabolite Z à partir du 4-HPA. Par ailleurs, les fractions 123, 124 et 125 de la gel filtration sont rassemblées. Elles contiennent la HPAC. Différentes réactions enzymatiques sont réalisées en utilisant l'HPAH et/ou l'HPAC. Ces réactions sont réalisées en deux temps. Une première réaction est réalisée avec l'HPAH (respectivement HPAC), elle est stoppée au bout de 30 minutes par un traitement thermique (100°C, 10 min). On ajoute alors la HPAC (respect. HPAH) et la réaction est poursuivie pour 30 minutes. La réaction est finalement arrêtée par un ajout d'acide perchlorique. Des réactions sont aussi réalisées en remplaçant l'une des enzymes par de l'eau. Enfin, des expériences équivalentes sont réalisées en filtrant les réactions sur NanosepTM 10 kD (Pall Filtron) au lieu de les bouillir.

Le tableau N°1 synthétise les résultats obtenus.

Expérience N°	"Enzyme" N°1	"Enzyme" N°2	Métabolite observé
	HPAH, HPAC	/	HGA
A	HPAH	H ₂ O	métabolite Z
B	HPAH	HPAC	HGA
C	H ₂ O	HPAC	/
D	HPAC	H ₂ O	/
E	HPAC	HPAH	métabolite Z
F	H ₂ O	HPAH	Métabolite Z

20

Nous observons que la seule manière de produire de l'HGA c'est d'avoir les deux protéines HPAH et HPAC simultanément ou successivement dans cet ordre. Lorsque l'HPAH est seule, ou lorsque l'HPAC est introduite avant l'HPAH, seul le métabolite Z est détectable. Enfin, la protéine HPAC n'a aucune activité enzymatique sur le 4-HPA. Ces résultats suggèrent que le métabolite Z est un intermédiaire réactionnel. L'HPAH convertirait le 4-HPA en métabolite Z, cette réaction permettant

l'oxydation du NADH, H^+ . Le métabolite Z serait alors converti en HGA par la HPAC. Les interactions physiques entre les deux protéines n'apparaissent pas nécessaires puisque la protéine HPAH peut être dénaturée ou éliminée par filtration avant ajout de l'HPAC. Nous avons montré *in vitro* que l'activité 4-HPA 1-hydroxylase dépendait des protéines HPAC et HPAH. Cependant la protéine HPAC n'est pas pure en sortie de gel filtration, elle est seulement enrichie. Il reste donc possible qu'en réalité se soit une autre protéine contenue dans cet extrait enrichi qui convertisse le métabolite Z en HGA. Pour éliminer les doutes, nous décidons de cloner les deux gènes (*hpaC* et *hpaH*) sur un même vecteur, nous devrions dans ce cas produire l'activité 4-HPA 1-hydroxylase et donc être capable de faire croître *P. putida* sur milieu minimum contenant du 4-HPA comme seule source de carbone.

II.2.10.4- Complémentation fonctionnelle de *P. putida* par *hpaH* et *hpaC*

Le plasmide pL1lac2 (Figure 9) est un vecteur pBBR1MCS-Gm^R contenant le gène *hpaC* sous la dépendance du promoteur de l'HPPD de *P. fluorescens* et en opposition, le gène *hpaH* sous la dépendance d'un promoteur *lac*. Le plasmide est introduit dans *P. putida* par électroporation. Les bactéries sont alors étalées sur milieu minimum contenant ou non du 4-HPA comme seule source de carbone. Après 5 jours, les colonies sont visibles seulement sur boîtes contenant le 4-HPA comme seule source de carbone. Au bout de 8 jours, les colonies sont de belles tailles. L'ADN plasmidique extrait à partir de ces colonies confirme la présence du plasmide pL1lac2 intègre. Par ailleurs *P. putida* est incapable de croître sur 4-HPA lorsque la bactérie est transformée avec le vecteur pBBR1MCS-GM^R contenant soit le gène *hpaC* soit le gène *hpaH*. La complémentation fonctionnelle obtenue dans cette expérience confirme que les gènes *hpaC* et *hpaH* sont nécessaires et suffisants pour instaurer l'activité 4-HPA 1-hydroxylase recherchée.

Exemple III : constructions des différentes cassettes d'expression cytosolique.

III.1 HPAC

Le gène HPAC a été isolé de *Pseudomonas acidovorans* par PCR sur un plasmide dérivé (p5kbC) d'une banque cosmidique d'ADN génomique, en utilisant les oligonucléotides suivants:

Start ORF1 (AflIII): GCAGGATGCA CATGTCCACC AAGAC

ORF1 Fin (HindIII): CGGACGCAAG CTTGCATCAG CCTTC

La réaction a été effectuée selon les conditions standards. Le fragment amplifié d'une taille de 993 pb a été sous-cloné dans le plasmide pGEMTeasy (Promega) selon le protocole du fournisseur. Le plasmide pOZ150 ainsi obtenu a été séquencé. La cassette
 5 obtenue par digestion EcoRI + SpeI a été clonée dans le plasmide pBluescriptII-KS+ ouvert par les mêmes enzymes pour donner le plasmide pEPA13. Le promoteur CsVMV est isolé du plasmide pCH27, dérivé du plasmide pUC19 contenant la cassette d'expression d'un gène de tolérance herbicide sous le contrôle du CsVMV. Pour cela une PCR standard a été réalisée sur thermocycler avec la Pfu polymérase générant des
 10 bouts francs; 1 cycle de 5 min à 95°C, 30 cycles [95°C 30 sec, 57°C 30 sec, 72°C 1 min], 72°C 3 min. Les amorces utilisées sont:

N-CsVMV: GCCCTCGAGG TCGACGGTAT TGATCAGCTT CC introduisant les sites XhoI et BclI

C-CsVMV: CGCTCTAGAA TTCAGATCTA CAAAC (EcoRI)

15 Le fragment de 565 pb généré est digéré par XhoI+EcoRI avant d'être inséré dans le plasmide pEPA13 préalablement digéré par XhoI+EcoRI; le plasmide pEPA14 est obtenu. Le terminateur Nos est isolé du plasmide pRD11, dérivé de pBlueScript II-SK(-) dans lequel est cloné le terminateur Nos, par digestion HindII+NotI. Le fragment de 292 pb obtenu est cloné dans le plasmide pEPA14 ouvert par les mêmes enzymes,
 20 donnant pEPA15.

Cassette pEPA15 = promoteur CsVMV-hpa C- terminateur Nos (Figure 10 ; SEQ ID NO 19)

III.2. HPAH

Le gène HPAH a isolé de Pseudomonas acidovorans par PCR sur un plasmide
 25 dérivé (p5kbC) d'une banque cosmidique d'ADN génomique, en utilisant les oligonucléotides suivants:

Start ORF2 (AflIII): CAGAGGACGA ACAACATGTC CCACC

ORF2 Fin 3(HindIII): CTGTGGATGA AGCTTAAGAG GTTCAGGC

La réaction a été effectuée selon les conditions standard. Le fragment amplifié
 30 d'une taille de 1729pb a été sous-cloné bouts-francs dans le plasmide pBlueScript II SK digéré par EcoRV. Le plasmide pEPA16 ainsi obtenu a été séquencé. Le promoteur CaMV 35S est isolé du plasmide pCH14, dérivé du plasmide pBI 121 contenant la cassette d'expression GUS: promoteur CaMV 35S-GUS-terminateur Nos. Pour cela une

PCR standard a été réalisée sur thermocycler avec la Pfu polymérase générant des bouts francs; 1 cycle de 5 min à 95°C, 30 cycles [95°C 30 sec, 63°C 30 sec, 72°C 1 min], 72°C 3 min. Les amorces utilisées sont:

N-CaMV: GCATGCCTCG AGCCACAGA TGG introduisant le site XhoI

5 C-CaMV: CCACCCGGGG ATCCTCTAGA G introduisant le site BamHI

Le fragment de 839 pb généré est digéré par XhoI+BamHI avant d'être inséré dans le plasmide pEPA16 préalablement digéré par XhoI + BclI; Le plasmide pEPA17 est ainsi obtenu. Le terminateur Nos est isolé du plasmide pRD11 par PCR, sous les mêmes conditions que précédemment, pour 1 cycle de 5 min à 95°C, 30 cycles [95°C 30 sec, 57°C 30 sec, 72°C 1 min], 72°C 3 min., avec les amorces suivantes:

N-Nos: CAAGCTTATC GATACCGTCG ACG introduisant HindIII

C-Nos: GAATTGCGGC CGCAATTCCC GACCTAGGA ACATAG introduisant NotI et AvrII.

15 Le fragment de 305 pb obtenu est digéré par NotI + HindIII avant d'être cloné dans le plasmide pEPA17 ouvert par les mêmes enzymes, donnant pEPA18.

Cassette pEPA18 = promoteur CaMV 35S-hpa H- terminateur Nos (Figure 11 ; SEQ ID NO17).

III.3. HPPO

20 Le gène HPPO a été isolé d'*Arthrobacter globiformis* par PCR sur le cosmide 2A issu d'une banque cosmique d'ADN génomique, en utilisant les oligonucléotides suivants:

N-term-HPPO-ScaI: GAATTCAGTA CTTCACTTAC AGTGTCCGGC introduisant les sites de restriction EcoRI et ScaI.

25 C-term-HPPO-AsuII-XhoI: GAATTCTCGA GTTCGAACAA ACTGAGTAGC AGCTCA introduisant les sites EcoRI, XhoI et AsuII

La réaction a été effectuée selon les conditions standard. Le fragment de 1800 pb obtenu est cloné dans le vecteur pGEMT-easy (Promega) selon le protocole du fournisseur. Le plasmide pOZ151 ainsi obtenu a été séquencé. La cassette obtenue par digestion SphI + XhoI a été clonée dans le plasmide pBBR1-MCS (Gm) ouvert par les 30 mêmes enzymes pour donner le plasmide pEPA20. Le promoteur simple histone est isolé du plasmide pCH9, dérivé du plasmide pUC19 contenant la cassette d'expression de l'EPSPS: promoteur simple histone-intron2-OTP-EPSPS-terminateur Histone. Pour cela une PCR standard a été réalisée avec Pfu polymérase générant des bouts francs; 1

cycle de 5 min à 95°C, 5 cycles [95°C 30 sec, 45°C 30 sec, 72°C 1 min], 30 cycles [95°C 30 sec, 65°C 30 sec, 72°C 1 min], 72°C 3 min. Les amorces utilisées sont:

N-SH: GCTTGCATGC CTAGGTCGAG GAGAAATATG introduisant les sites SphI et AvrII

5 C-SH: CATGAGGGGT TCGAAATCGA TAAGC

Le fragment de 970 pb généré est digéré par SphI avant d'être inséré dans le plasmide pEPA20 préalablement digéré par SphI + ScaI; Dans le plasmide pEPA21 obtenu, l'ATG d'initiation du gène HPPO est recréé derrière le promoteur Simple Histone. Le terminateur Histone est isolé du même plasmide pCH9 par PCR, sous les
10 mêmes conditions que précédemment, pour 1 cycle de 5 min à 95°C, 35 cycles [95°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 min], 72°C 3 min., avec les amorces suivantes:

N-Hister: CTAGACCTAG GGGATCCCCC GATC introduisant AvrII

C-Hister: CCCACTAGTG TTAAATGAT CAGTCAGGCC GAAT introduisant SpeI et BclI.

15 Le fragment de 726 pb obtenu est digéré par SpeI + AvrII avant d'être cloné dans le plasmide pEPA21 ouvert par SpeI, donnant pEPA22.

Cassette pEPA22 = promoteur simple histone-hppO-terminateur histone (Figure 12 ; SEQ ID NO 15).

III.4. Association des gènes

20 La cassette contenant le gène HPAC est extraite de pEPA15 par digestion NotI et clonée dans pEPA18 (NotI+Bsp120I) pour former pEPA19 (Figure 13 ; SEQ ID NO 21). Ce dernier est digéré par AvrII pour cloner la cassette extraite dans les sites AvrII+SpeI de pEPA22. Le plasmide contenant les trois constructions est pEPA23 (Figure 14 ; SEQ ID NO 22).

25 III.5. Vecteur binaire

Afin de transformer les plantes par *Agrobacterium*, les trois constructions sont extractibles par BclI afin d'être introduites dans un vecteur binaire d'*Agrobactéries*.

Abréviations :

3,4-DHPA	acide 3,4-dihydroxyphénylacétique
4-HPA	acide 4-hydroxyphénylacétique
ADN	acide désoxyribonucléique
5 APcI	Ionisation chimique à Pression Atmosphérique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
BET	bromure d'éthidium
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
10 BSA	albumine de sérum bovin
C ¹⁰⁰	carbénicilline (100 µg/mL)
CRLD	Centre de Recherche La Dargoire
Da	Dalton
DKN	dicétonitrile de l'isoxaflutole
15 DMSO	diméthylsulfoxyde
dATP	2'désoxyadénosine 5'-triphosphate
dCTP	2'désoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	2'désoxyguanosine 5'-triphosphate
dNTP	2'-désoxynucléotides 5'-triphosphate
20 dTTP	2'désoxythymidine 5'-triphosphate
DTE	dithioérrithriol
DTT	1,4-dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
FAD	flavine adénine dinucléotide
25 FPLC	"fast protein liquid chromatography"
Gm ²⁰	gentamycine (20µg/mL)
HGA	acide homogentisique
HPLC	chromatographie liquide haute performance
HPP	acide hydroxyphénylpyruvique
30 HPPD	acide hydroxyphénylpyruvique dioxygénase
HPPO	hydroxyphénylpyruvate oxydase
IFT	isoxaflutole
IPTG	isopropyl-β-thiogalactopyranoside

	Kn ⁵⁰	kanamycine (50 µg/mL)
	kb	kilo bases
	Km	constante de Michaelis Menten
	L-DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
5	LB	milieu de Luria Bertani
	min	minutes
	mJ	milli-joules
	MNDD	<i>manganese dependant dioxygenase</i>
	<i>MndD</i>	gène codant la MNDD
10	NAD ⁺ (H,H ⁺)	nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée/forme réduite)
	OGM	Organisme génétiquement modifié
	OTP	<i>Optimised Transit Peptid</i> ; peptide de transit optimisé
	pb	paire de bases
15	pBBR1MCS-Gm	plasmide pBBR1MCS résistant à la gentamycine
	PCR	réaction de polymérisation en chaîne
	ppm	partie par million; mg.L ⁻¹
	PVDF	polyvinylène difluoride
	qsp	quantité suffisante pour
20	Q.r.	coefficient respiratoire
	Rif ¹⁰⁰	Rifampicine (100 µg/mL)
	RMN	résonance magnétique nucléaire
	SDS	dodécyle sulfate de sodium
	sec	seconde
25	TBE	tris borate EDTA
	TEV	" <i>tobacco etch virus</i> "
	TFA	acide trifluoroacétique
	TrEMBL	banque génomique EMBL traduite (<i>translated EMBL bank</i>)
30	Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
	U.V.	ultra-violet
	vs	<i>versus</i>
	X-gal	5-bromo-4-chloro-3-β-D-galactopyranoside

Références

- Abe, H. ; Uchiyama, M. ; Sato, R. (1974) Isolation of phenylacetic acid and its p-hydroxyderivative as auxin-like substances from *Undaria pinnatifida*. *Agric. Biol. Chem.* **38** : 897-898
- 5 Adachi, K.; Takeda, Y.; Senoh, S.; Kita, H. (1964) Metabolism of p-hydroxyphenylacetic acid in *Pseudomonas ovalis*. *Biochem. Biophys. Acta* **93**: 483-493
- Appert, C.; Logemann, E.; Hahlbrock, K.; Schmid, J.; Amrhein, N.; (1994) Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.); *Eur. J. Biochem.*; **225**:491-499
- 10 Arunachalam, U.; Massey, V.; Vaidyanathan, C.S. (1992) p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **267**: 25848-25855
- Arunachalam, U.; Massey, V. (1994) Studies on the oxidative half-reaction of p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **269**: 11795-11801
- Arunachalam, U.; Massey, V.; Miller, S.M. (1994) Mechanism of p-
- 15 hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **269**: 150-155
- Aubert, S. (1994) Effet multiples du glycérol sur le métabolisme de la cellule végétale non chlorophyllienne. These. Université Joseph Fourier – Grenoble - France
- Aubert, S.; Gout, E.; Bligny, R.; Marty-Mazars, D.; Barrieu, F.; Alabouvette, J; Marty, F.; Douce, R. (1996a) Ultrastructural and biochemical characterization of
- 20 autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *J. Cell Biol.* **133**: 1251-1263
- Aubert, S.; Alban, C.; Bligny, R.; Douce, R. (1996b) Induction of beta-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase in higher plant cells during carbohydrate starvation: evidence for a role of MCCase in leucine metabolism. *FEBS Lett.* **383**: 175-
- 25 180
- Aubert, S.; Bligny, R.; Douce, R. (1996c). NMR studies of metabolism in cell suspensions and tissue cultures, in "Nuclear Magnetic Resonance in Plant Physiology" (Y. Shachar-Hill and P. Pfeffer, Eds.), pp.109-154, American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA.
- 30 Aubert, S.; Bligny, R.; Day, D.A.; Whelan, J.; Douce, R. 1997. Induction of alternative oxidase synthesis by herbicides inhibiting branched-chain amino acid synthesis. *Plant J.* **11**:649-657
- Aubert, S. ; Curien, G. ; Bligny, R. ; Gout, E. ; Douce, R. (1998) Transport,

- compartmentation and metabolism of homoserine in higher plant cells. Carbon-13 and phosphorus-31-nuclear magnetic resonance studies. *Plant Physiol.* **116** : 547-557
- Aubert, S.; Pallett, K. (2000) Combined use of ^{13}C - and ^{19}F -NMR to analyse the mode of action and the metabolism of the fluoride herbicide isoxaflutole. *Plant Physiol. Biochem.*, **38** : 517-523
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (1995) Current protocols in molecular biology(volume 1-4). Wiley ed., Massachusetts General Hospital & Harvard Medical School.
- Bate, N.J.; Orr, J.; Ni, W.; Meromi, A.; Nadler-Hassar, T.; Doerner, P.W.; Dixon, R.A.; Lamb, C.J.; Elkind, Y. (1994) Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7608-12
- Battersby, A.R.; Chrystal, E.J.; Staunton, J. (1980) Studies of enzyme-mediated reactions. Part 12. Stereochemical course of the decarboxylation of (2S)-tyrosine to tyramine by microbial, mammalian and plant systems. *J. Chem. Soc.* **1**: 31-42
- Bickel, H.; Palmé, L.; Schultz, G. (1978) Incorporation of shikimate and other precursors into aromatic amino acids and prenylquinones of isolated spinach chloroplasts. *Phytochemistry*. **17**: 119-124
- Bickel, H.; Buchholz, G.; Schultz, G. (1979) On the compartmentation of the biosynthesis of aromatic amino acids and prenylquinones in higher plants. In *Advances in the biochemistry and physiology of plant lipids*, Appelqvist, L.A. Liljenberg, C., eds. Elsevier, Amsterdam pp 369-375
- Biswas, I. ; Gruss, A. ; Ehrlich, S.D. ; Maguin, E. (1993) High-efficiency gene inactivation and replacement system for Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **175** : 3628-3635
- Blakley, E.R. (1977) The catabolism of L-tyrosine by an *Arthrobacter* sp., *Can. J. Microbiol.* **23** : 1128-1139
- Bligny, R. ; Leguay, J.J. (1987) Techniques of cell cultures. *Meth. Enzymol.* **148** : 3-16
- Boehringer Mannheim (1995) The DIG system user's guide for filter hybridization
- Boldt, Y.R.; Sadowsky, M.J.; Ellis, L.B.M.; Que, L.; Wackett, L.P. (1995) A

- Manganese-dependent Dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2 belongs to the major extradiol dioxygenase family. *J. Bacteriol.* **177**: 1225-1232
- Borresen, T.; Klausen, N.K.; Larsen, L.M.; Sorensen, H. (1989) Purification and characterisation of tyrosine decarboxylase and aromatic-L-amino-acid decarboxylase. *Biochem. Biophys. Acta* **993** : 108-115
- 5 Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254
- Brouquisse, R.; James, F.; Pradet, A.; Raymond, P. (1992) Asparagine metabolism and nitrogen distribution during protein degradation in sugar-starved maize root tips. *Planta*. **188**: 384-395
- 10 Callis, J. (1995) regulation of proteine degradation. *Plant Cell*. **7** : 845-857
- Campos-Garcia J., Najera R., Camarena L., Soberon-Chavez G. (2000) The *Pseudomonas aeruginosa* motR gene involved in regulation of bacterial motility. *FEMS Microbiol Lett.* **184**: 57-62
- 15 Chan, M.T.; Chao, Y.C.; Yu, S.M. (1994) Novel gene expression system for plant cells based on induction of alpha-amylase promoter by carbohydrate starvation. *J. Biol Chem.* **269**: 17635-17641
- Chang, A.K.; Duggleby, R.G. (1997) Expression, purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *Biochem. J.* **327**: 161-169
- 20 Chevalier, C.; Bourgeois, E.; Just, D.; Raymond, P.; (1996) Metabolic regulation of asparagine synthetase gene expression in maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant J.* **9**: 1-11
- 25 Chua, N.H. (1980) electrophoretic analysis of chloroplast proteins. *Methods Enzymol.* **69** : 434-446
- Coligan, J.E.; Dunn, B.M.; Ploegh, H.L.; Speicher, D.W.; Wingfield, P.T. Current protocols in protein science. Wiley ed.
- Coligan, J.E. (1997) Chapter 11 : Chemical analysis in *Current Protocols in Protein Science*. Coligan, J.E. ; Dunn, B.M. ; Ploegh, H.L. ; Speicher, D.W. ; Wingfield, P.T. (eds.) Wiley. Vol. 1.
- 30 David, C.; Daro, A.; Szalai, E.; Atarhouch, T.; Mergeay, M.(1996) Formation of polymeric pigments in the presence of bacteria and comparison with chemical oxidative

- coupling-II. Catabolism of tyrosine and hydroxyphenylacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* CH34 and mutants. *Eur. Polym. J.*, 32: 669-679
- De Lorenzo V., Herrero M., Jakubzik U., Timmis K.N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol.* 172: 6568-6572
- D'Souza LM, Willson RC, Fox GE (2000) Expression of marker RNAs in *Pseudomonas putida* *Curr Microbiol.* 40: 91-95
- Despeghel, J.P. ; Delrot, S. (1983) Energetics of amino acids uptake by *Vicia faba* leaf tissue. *Plant Physiol.* 71 : 1-6
- Dey & Harborne (1997) *Plant Biochemistry*, page 389, Ed. P.M. Dey & J.B. Harborne, Academic Press
- Fedi S., Brazil D., Dowling D.N., O'Gara F. (1996) Construction of a modified mini-Tn5 lacZY non-antibiotic marker cassette: ecological evaluation of a lacZY marked *Pseudomonas* strain in the sugarbeet rhizosphere. *FEMS Microbiol Lett.* 135: 251-257
- Feretti, L. ; Sgaramella, V. (1981) Specific and reversible inhibition of the blunt end joining activity of the T4 DNA ligase. *Nucleic Acid Res.* 9 : 3695-3705
- Ferrandez, A. ; Garcia, J.L. ; Diaz, E. (1997) Genetic characterization and expression in heterologous hosts of the 3-(3-hydroxyphenyl)-propionate catabolic pathway of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* 179 : 2573-2581
- Filleur, S.; Daniel-Vedele, F. (1999) Expression analysis of a high affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* 207: 461-469
- Flodin, C.; Whitfield, F.B. (1999) 4-hydroxybenzoic acid: a likely precursor of 2,4,6-tribromophenol in *Ulva lactuca*. *Phytochemistry.* 51: 249-255
- Flügge, U.-I. (1998) Metabolite transporters in plastids. *Curr. Opinion Plant Biotech.*, 1: 201-206
- Folch, J. ; Lees, M. ; Sloane-Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509
- Frommer, W.B. ; Kwart, M. ; Hirner, B. ; Fischer, W.N. ; Hummel, S. ; Ninnemann, O. (1994) Transporters for nitrogenous compounds in plants. *Plant Mol. Biol.* 26 : 1651-1670
- Gaines, C.G.; Byng, G.S.; Whitaker, R.J.; Jensen, R.A. (1982) L-tyrosine

- regulation and biosynthesis via arogenate dehydrogenase in suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca* L. *Planta*, **156**: 233-240
- 5 Galan, B.; Diaz, E.; Prieto, M.A. (2000) Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W : a prototype of a new flavin :NAD(P)H reductase subfamily. *J. Bacteriol.* **182** : 627-636
- Garcia, I.; Rodgers, M.; Lenne, C.; Rolland, A.; Sailland, A.; Matringe, M. (1997) Subcellular localisation and purification of a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells and characterisation of the corresponding cDNA. *Biochem. J.* **325**: 761
- 10 Garcia, I.; Rodgers, M.; Pépin, R.; Ksieh, T.-F.; Matringe, M. (1999) Characterization and subcellular compartmentation of recombinant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Arabidopsis* in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **119** : 1507-1516
- Gazzarini, S.; Lejay, L.; Gojon, A.; Ninnemann, O.; Frommer, W.B.; von Wiren, N. (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* . **11**: 937-948
- 15 Genix, P.; Bligny, R.; Martin, J.B.; Douce, R. (1990) Transient accumulation of asparagine in sycamore cells after a long period of sucrose starvation. *Plant Physiol.* **94**: 717-722
- 20 Georgalaki, M.D.; Sarantinopoulos, P.; Ferreira, E.S.; De Vuyst, L.; Kalantzopoulos, G.; Tsakalidou, E. (2000) Biochemical properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasseri cheese. *J. Appl. Microbiol.* **88** : 817-825
- 25 Goodchild, J.A.; Givan, C.V. (1990) Influence of ammonium and external pH on the amino and organic acid content of suspension culture cells of *Acer pseudoplatanus* L. *Physiol. plant* **78**: 29-37
- Goodwin & Mercer (1988) Introduction to plant biochemistry, 2nd edition. Pergamon Press p. 356
- 30 Gout, E.; Bligny, R.; Genix, P.; Tissut, M.; Douce, R. (1992). Effect of glyphosate on plant cell metabolism. ³¹P and ¹³C NMR studies. *Biochimie*. **74**: 875-882
- Greenberg, D.M. () Metabolic pathways. Amino acids and tetrapyrroles, 3rd edition, Academic Press, vol. III : p. 148

- Gross, D. (1975) Growth regulating substances of plant origin. *Phytochemistry*, **14** : 2105-2112
- Grunstein, M. ; Hogness, D.S. (1975) Colony hybridization : a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72** : 3961-3965
- Hahlbrock, K.; Scheel, D.; (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*; **40**: 347-369
- Hareland, W.A.; Crawford, R.L.; Chapman, P.J.; Dagley, S. (1975) Metabolic function and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 1-hydroxylase from *Pseudomonas acidovorans*. *J. Bacteriol.*, **121**: 272-285
- Hess, J.L. (1993) Vitamine E, α -Tocophérols. In Antioxidans in Higher Plants Edited by Alscher, R.; Hess, J.; Boca Raton: CRC: p.:111-134
- Hill, C.M.; Duggleby, R.G. (1998) Mutagenesis of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase isoenzyme II and characterization of three herbicide-insensitive forms. *Biochem. J.* **335** : 653-661
- Homeyer, U.; Litek, K.; Huchzermeyer, B.; Schultz, G. (1989) Uptake of phenylalanine into isolated barley vacuoles is driven by both tonoplast adenosine triphosphatase and pyrophosphatase. *Plant Physiol.* **89**: 1388-1393
- Jones, D.; Keddle, R.M. (1991) The genus *Arthrobacter*. In: The procaryotes (Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K.H., eds.) 2nd eds., Springer-Verlag, New-York
- Journet E.P., Bligny R., Douce R. (1986) Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *J. Biol. Chem.* **261**: 3193-3199
- Junge, K.; Gosink, J.J.; Hoppe, H.-G.; Staley, J.T. (1998) *Arthrobacter*, *Brachybacterium* and *Planococcus* isolates identified from antarctic sea ice brine. Description of *Planococcus mcmeekinii*, sp. nov.. *System. Appl. Microbiol.*, **21**: 306-314
- Kaiser, G.; Martinoia, E.; Wiemken, A. (1982) Rapid appearance of photosynthetic products in the vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts by a new fast method. *Z. Pflanzenphysiol.* **107** : 103-113
- Keen, N.T., Tamaki, S., Kobayashi, D., Trollinger, D., (1988), Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria, *Gene*, **70**, 191-197
- Kindl, H. (1969) Biosynthesis and metabolism of hydroxyphenylacetic acids in higher plants. *Eur. J. Biochem.* **7**: 340-347

- Koch, C.; Schumann, P.; Stackebrandt, E. (1995) Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 837-839
- Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM 2nd, Peterson KM (1994)
5 pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16: 800-802
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM 2nd, Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176
- Kruk, J.; Strzalka, K. (1998) Identification of plastoquinone-C in spinach and
10 maple leaves by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochemistry* 49: 2267-2271
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-683
- Lamport, D.T.A.; Northcote, D.H. (1960) Hydroxyproline in primary cell walls of
15 higher plants. *Nature*: 188: 665-666
- Laursen, R.A. (1971) Solid-phase Edman degradation. An automatic peptide sequencer. *Eur. J. Biochem.* 20 : 89-102.
- Li, Z.-C; Bush, D.R. (1990) Δ pH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves. I. Evidence for carrier-mediated,
20 electrogenic flux through multiple transport systems. *Plant Physiol.* 94: 268-277
- Li, Z.-C; Bush, D.R. (1991) Δ pH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. II. Evidence for multiple aliphatic, neutral amino acid symports. *Plant Physiol.* 96: 1338-1344
- Liu, D.-L.; Xu, S.-X.; Wang, W.-F. (1998) a novel lignan glucoside from
25 *Forsythia suspensa* Vahl. *J. Chin. Pharmaceut. Sci.* 7: 49-51
- Löffelhardt, W. (1977) The biosynthesis of phenylacetic acids in blue-green alga *Anacystis nidulans*: evidence for the involvement of a thylakoid-bound L-amino acid oxidase. *Z. Naturforsch.* 32: 345-350
- Luscombe, B.M.; Palett, K.E.; Loubierre, P.; Millet, J.-C.; Melgarejo, J.; Vrabel,
30 T.E. (1995) RPA 201772 a novel herbicide for broad leaf and grass weeds control in maize and sugar cane, *Proc. Brighton Crop Prot. Conf. Weeds*, 1: 35
- Luscombe, B.M.; Palett, K.E.; (1996) Isoxaflutole for weed control in maize, *Pesticide Outlook*, December, 29

- Lutterbach, R.; Stöckigt, J. (1994) *in vivo* investigation of plant cell metabolism by means of natural-abundance ^{13}C -NMR spectroscopy. *Helv. Chim. Acta*, 77: 2153-2161
- Lutterbach, R.; Stöckigt, J.; (1995), Dynamics of the biosynthesis of methylursubin in plant cells employing *in vivo* ^{13}C -NMR without labelling. *Phytochemistry*, 40: 801-806
- MacLaughlin, P.J.; Weihrauch, J.L. (1979) Vitamine E content of foods. *J. Am. Diet. Assoc.* 75: 647-665
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J. (1982) Molecular cloning – A laboratory manual eds Cold Spring Harbor Laboratory
- Martin, M. ; Gibello, A. ; Fernandez, J. ; Ferrer, E. ; Garrido-Pertierra, A. (1991) Catabolism of 3- and 4-hydroxyphenylacetic acid by *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 132 : 621-628.
- Mayer, M.P. ; Beyer, P. ; Kleinig, H. (1990) Quinone compounds are able to replace molecular oxygen as terminal electron acceptor in phytoen desaturation in chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus* L. *Eur. J. Biochem.* 191 : 359-363
- Mayer, M.P.; Nievelstein, V.; Beyer, P. (1992) Purification and characterization of a NADPH dependent oxidoreductase from chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus*: a redox-mediator possibly involved in carotene desaturation. *Plant Physiol. Biochem.* 30: 389-398
- Mazelis, M. (1980) Amino acid metabolism. In "the biochemistry of plants" (Stumpf, PK, Conn, E.E; eds.), vol.5: amino acids and derivatives. Academic press, London, New York, pp: 1-55
- Michal, G. - ed.- (1999) Biochemical Pathways, An atlas of biochemistry and molecular biology, Wiley & Spektrum eds., p. 60
- Miflin, B.J. ; Lea, P.J. (1982) Ammonium assimilation and amino acid metabolism. In A.B. Boulter, B. Parthiers, eds, Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 14, Nucleic Acids and Proteins in Plants 1. Springer Verlag, Berlin, PP : 5-64
- Moreno-Arribas, V. ; Lonvaud-Funel, A. (1999) Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters*. 180 : 55-60
- Moreno-Arribas, V. ; Torlois, S. ; Joyeux, A. ; Bertrand, A. ; Lonvaud-Funel, A. (2000) Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria

from wine. *J. Appl. Microbiol.* **88** : 584-593

Morot-Gaudry, J.F. (1997) Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. INRA Editions.

Mouillon, J.M.; Aubert, S.; Bourguignon, J.; Gout, E.; Douce, R.; Rebeillé, F.
5 (1999)

Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism. *Plant J.* **20**: 197-205

Murashige, T.; Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473

10 Negrel, J.; Javelle, F.; (1995); Induction of phenylpropanoid and tyramine metabolism in pectinase or pronase elicited cell suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*); *Physiologia Plantarum*, **95**: 569-574.

Nester, E.W.; Montoya, A.L. (1976) An enzyme common to histidine and aromatic amino acid biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **126**: 699-705

15 Norris, S.R.; Barette, T.R.; DellaPenna, D. (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* **7**: 2139-2149

Pallett, K.E.; Little, J.P.; Sheekey, M.; Veerasekaran, P. (1998) The mode of action of Isoxaflutole. I. Physiological effects, metabolism and selectivity. *Pestic.*
20 *Biochem. Physiol.* **62** : 113-124

Prieto, M.A.; Perez-Randa, A.; Garcia, J.L. (1993) Characterization of an *Escherichia coli* aromatic hydroxylase with a broad substrat range. *J. Bacteriol.* **175**: 2162-2167

Prieto, M.A.; Garcia, J.L.; (1994) Molecular characterization of 4-
25 hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 22823-22829

Prieto, M.A. ; Diaz, E. ; Garcia, J.L. (1996) Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W : engineering a mobile aromatic degradative cluster. *J. Bacteriol.* **178** : 111-120

30 Prieto M.A., Kellerhals M.B., Bozzato G.B., Radnovic D., Witholt B., Kessler B. (1999) Engineering of stable recombinant bacteria for production of chiral medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 3265-3271

Roberts, J.K.M. (2000) NMR adventures in the metabolic labyrinth within plants.

Trends Plant Sci. 5: 30-34

- Roby, C.; Martin, J.B.; Bligny, R.; Douce, R. (1987) Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. Phosphorus-31 nuclear resonance magnetic studies. *J. Biol. Chem.* 262: 5000-5007
- 5 Sailland, A.; Matringe, M.; Rolland, A.; Pallett, K. (1995) Gène de l'hydroxyphényl pyruvate dioxygénase et obtention de plantes contenant ce gène résistantes aux herbicides. WO 96/38567
- Sailland, A., Derose, R. (1999) Method for enzymatic preparation of homogentisate. WO9934008 A 19990708
- 10 Sambrook; Fritsch; Maniatis. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edition
- Schroeder, C.; Sommer, J.; Humpfer, E.; Stöckigt, J. (1997) Inverse correlated ¹H-¹³C in vivo NMR as a probe to follow the metabolism of unlabelled vanillin by plant cell cultures. *Tetrahedron*, 53: 927-934
- Schoenle, E.J.; Adams, L.D.; Sammons, D.W. (1984) Insulin-induced rapid
- 15 decrease of a major protein in fat cell plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 259 : 12112-12116
- Shachar-Hill, Y.; Pfeffer, P.E.; Germann, M.W. (1996) Following plant metabolism in vivo and in extracts with heteronuclear two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytic. Biochem.*, 243: 110-118
- 20 Singer, M.; Berg, P. (1992) Genes & Genomes. Ed. VIGOT, Paris
- Sparnins, V.L.; Dagley, S. (1975) Alternative routes of aromatic catabolism in *Pseudomonas acidovorans* and *Pseudomonas putida*: Gallic acid as a substrate and inhibitor of dioxygenases. *J. Bacteriol.* 124 : 1374-1381
- Stafford, H.A.; (1994) Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually
- 25 exclusive pathways. *Plant Sci.*; 101: 91-98
- Suemori, A.; Nakajima, K.; Kurane, R.; Nakamura, Y. (1995) L-Phenylalanine and L-Tyrosine degradative pathways in *Rhodococcus erythropolis*. *Report Nat. Inst. Biosci. Hum. Tech.* 3: 33-36
- Suemori, A.; Nakajima, K.; Kurane, R.; Nakamura, Y. (1996) Purification and
- 30 characterization of o-hydroxyphenylacetate 5-hydroxylase, m-hydroxyphenylacetate 6-hydroxylase and p-hydroxyphenylacetate 1-hydroxylase from *Rhodococcus erythropolis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81: 133-137
- Swiatek, L.; Grabias, B.; Kalembe, D. (1998) Phenolic acids in certain medicinal

plants of the genus *Artemisia*. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 4: 158-160

Swiatek, L. (1977) kwasy fenolowe I Glukozydy irydoidowe w niektórych krajowych gatunkach leczniczych z rodzaju *Plantago*. *Herba Polonica XXIII* (3): 201-209

- 5 Takizawa, N.; Yokoyama, H.; Yanagihara, K.; Hatta, T.; Kiyohara, H. (1995) A locus of *Pseudomonas pickettii* DTP0602. *had*, that encodes 2,4,6-trichlorophenol 4-dechlorinase with hydroxylase activity, and hydroxylation of various chlorophenols by the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* 80: 318-326

- 10 Trieu-Cuot, P. ; Carlier, C. ; Poyart-Salmeron, C. ; Courvalin, P. (1991) An integrative vector exploiting the transposition properties of Tn1545 for insertional mutagenesis and cloning of genes from Gram-positive bacteria. *Gene* 106: 21-27

Tseng, T.C.; Tsai, T.H.; Lue, M.Y.; Lee, H.T. (1995) Identification of sucrose-regulated genes in cultured rice cells using mRNA differential display. *Gene*. 161: 179-1782

- 15 Vertes, A.; Asai, Y.; Inui, M.; Kobayashi, M.; Kurusu, Y.; Yukawa, H., (1994) Transposon mutagenesis of Coryneform bacteria, *Mol. Gen. Genet.*, 245, 397-405

Vierstra, R.D. (1993) Protein degradation in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44 : 385-410

- 20 Viviani, F.; Little, J.; Pallett, K.E. (1998) Mode of action of Isoxaflutole - 2-Characterisation of the inhibition of the carrot 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by the diketonitrile derivative of isoxaflutole; *Pestic. Biochem. Physiol.* 62 : 125-134

- Whistance, G.R.; Threlfall, D.R. (1970) Biosynthesis of phytoquinones. Homogentisic acid: a precursor of plastoquinones, tocopherols and alpha-tocopherolquinone in higher plants, green algae and blue-green algae. *Biochem. J.* 117: 593-600

Xun, L.Y. (1996) Purification and characterization of chlorophenol 4-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Bacteriol.* 178: 2645-2649

- 30 Xun, L. & Sandvik, E.R. (2000) Characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase (*HpaB*) of *Escherichia coli* as a reduced Flavin Adenine Dinucleotide-utilizing monooxygenase. *Appl. Env. Microbiol.* 66 : 481-486

Revendications

1. Procédé permettant de rendre les plantes tolérantes à un herbicide caractérisé en ce que l'on exprime dans lesdites plantes au moins une enzyme
5 permettant le contournement de la voie métabolique inhibée par ledit herbicide.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'herbicide est un inhibiteur d'HPPD.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on exprime dans la plante une HPP oxydase et/ou une HPAH et/ou une HPAC.
- 10 4. Polypeptide, caractérisé en ce qu'il possède une activité HPP oxydase.
5. Polypeptide selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est insensible aux inhibiteurs d'HPPD.
6. Polypeptide selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO 2, ses fragments et ses
15 séquences homologues.
7. Polypeptide selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides aminés sélectionnée parmi le groupe comprenant SEQ ID NO 4 et SEQ ID NO 6, leurs fragments et leurs séquences homologues
8. Polypeptide, caractérisé en ce qu'il possède une activité HPAH.
- 20 9. Polypeptide selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il est insensible aux inhibiteurs d'HPPD.
10. Polypeptide selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO 8, ses fragments et ses séquences homologues.
- 25 11. Polypeptide, caractérisé en ce qu'il possède une activité HPAC.
12. Polypeptide selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il est insensible aux inhibiteurs d'HPPD.
13. Polypeptide selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO 10, ses fragments et ses
30 séquences homologues.
14. Polypeptide selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides aminés sélectionnée parmi le groupe comprenant SEQ ID NO 12 et SEQ ID NO 14, leurs fragments et leurs séquences homologues

15. Séquence d'acide nucléique caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide selon l'une des revendications 4 à 14.
16. Séquence d'acide nucléique codant pour une HPP oxydase, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'acide nucléique sélectionnée parmi le groupe comprenant les séquences codantes des SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 15, leurs séquences homologues, leurs fragments et les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites SEQ ID NO 1, 3, 5 ou 15.
17. Séquence d'acide nucléique codant pour une HPAH, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'acide nucléique sélectionnée parmi le groupe comprenant les séquences codantes des SEQ ID NO 7 ou SEQ ID NO 17, leurs séquences homologues, leurs fragments et les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites SEQ ID NO 7 ou 17.
18. Séquence d'acide nucléique codant pour une HPAC, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'acide nucléique sélectionnée parmi le groupe comprenant les séquences codantes des SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13 ou SEQ ID NO 19, leurs séquences homologues, leurs fragments et les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites SEQ ID NO 9, 11, 13 ou 19.
19. Cassette d'expression comprenant une séquence codante, caractérisée en ce que la séquence codante comprend une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 15 à 18.
20. Vecteur de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cassette d'expression selon la revendication 19.
21. Cellule végétale transformée, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une cassette d'expression selon la revendication 19.
22. Plante transformée, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une cassette d'expression selon la revendication 19.
23. Graines de plantes transformées selon la revendication 22, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une cassette d'expression selon la revendication 19.
24. Procédé de transformation des plantes, caractérisé en ce que l'on introduit dans leur génome au moins une cassette d'expression selon la revendication 19.

25. Procédé de désherbage sélectif de plantes, notamment de cultures, à l'aide d'un inhibiteur de l'HPPD, caractérisé en ce qu'on applique cet herbicide sur des plantes transformées selon la revendication 22.

26. Procédé de contrôle des mauvaises herbes dans une surface d'un champ comprenant des graines selon la revendication 23 ou des plantes transformées selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend l'application dans la dite surface du champ d'une dose toxique pour les dites mauvaises herbes d'un herbicide inhibiteur d'HPPD, sans toutefois affecter de manière substantielle les graines ou plantes transformée selon l'invention.

27. Procédé de culture des plantes transformées selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend le semis des graines selon la revendication 23 dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, l'application sur la dite surface du dit champ une dose toxique pour les mauvaises herbes d'un herbicide ayant pour cible l'HPPD en cas de présence de mauvaises herbes, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis la récolte des plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement la séparation des graines des plantes récoltées.

28. Procédé selon l'une des revendications 25 à 27, caractérisé en ce que l'herbicide est appliqué en pré-semis et/ou en post-levée.

1/7

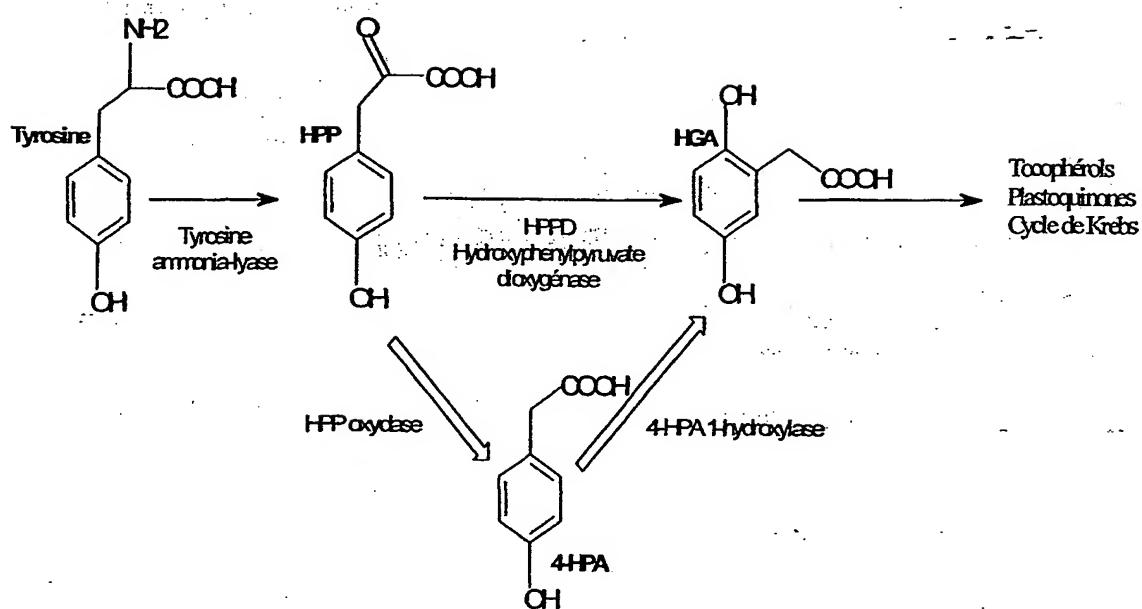


Figure 1

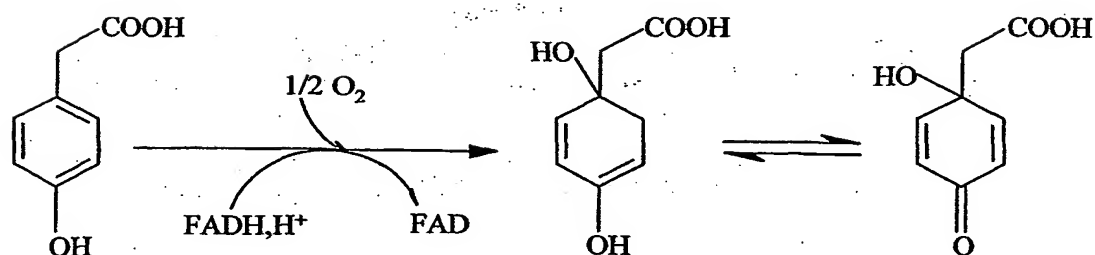


Figure 2

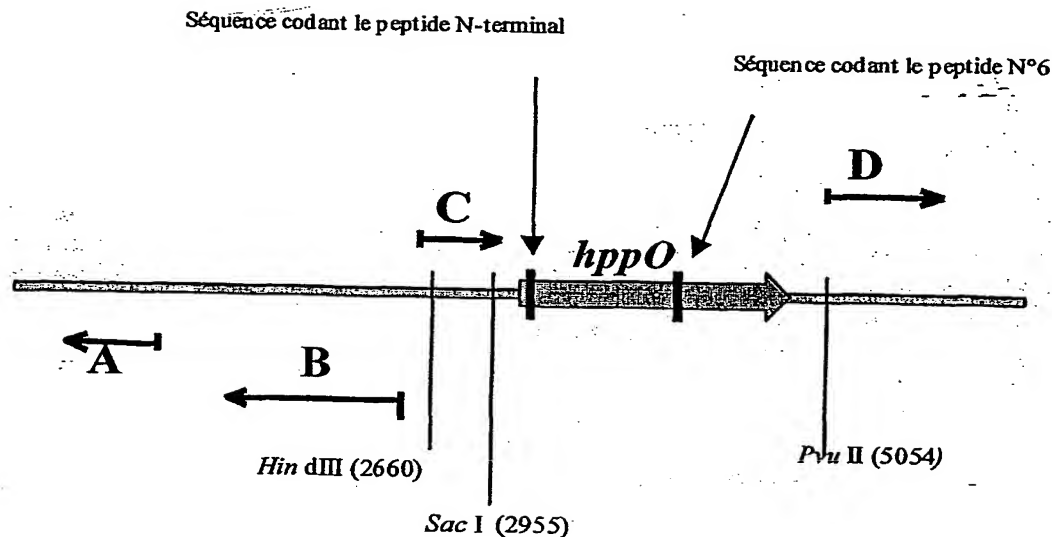


Figure 3

SacI

2901 TTTGGAAATC GACGGGATCC AGCGGACCAG CACTGCCATC TCCGTCGTGG
AAACCTTTAG CTGCCCTAGG TCGCCTGGTC GTGACGGTAG AGGCAGCACC

SacI
~~~~~

2951 AGCTCATGCC GCCCCGCTAT GACGGCCTGC TGGCCCGGCT GTCCCAGCAG  
TCGAGTACGG CGGGGCGATA CTGCCGGACG ACCGGGCCGA CAGGGTCGTC

3001 GAGAGCCGCC ATCCCAGCTA GGGCATAGGT GATCCGCACC ACCTTTGAGC  
CTCTCGGCGG TAGGGTCGAT CCCGTATCCA CTAGGCGTGG TGGAAACTCG

3051 ATATTTGCAG TAGCTACTGT GATAAACTGC CAAAAATACC AGCTCATGTC  
TATAAACGTC ATCGATGACA CTATTTGACG GTTTTTATGG TCGAGTACAG

+2

3101 TGTTCACTTG CCAATCGCTG ATCCAGATCC GACGATTCCT GCATGACTTC  
ACAAGTGAAC GGTTAGCGAC TAGGTCTAGG CTGCTAAGGA CGTACTGAAG

+2

3151 ACTTACAGTG TCCGGCCGGG TGGCGCAGGT CCTCAGCAGC TATGTCAGCG  
TGAATGTCAC AGGCCGGCCC ACCGCGTCCA GGAGTCGTGG ATACAGTCGG

... ..

... ..

... ..

+2 ----->

4801 GGCGAAGGAG GCGGTGGCGG GCTAGGGCCG GCCTCGTCGA AATGCCGCCC  
CCGCTTCCTC CGCCACCGCC CGATCCCGGC CGGAGCAGCT TTACGGCGGG

4851 TCCAACCCAA CTCAGTACCA GCTCAGGGCG TTCTCAGGGC TGGGAACGCC  
AGGTTGGGTT GAGTCATGGT CGAGTCCCGC AAGAGTCCCG ACCCTTGCGG

3/7

Figure 4

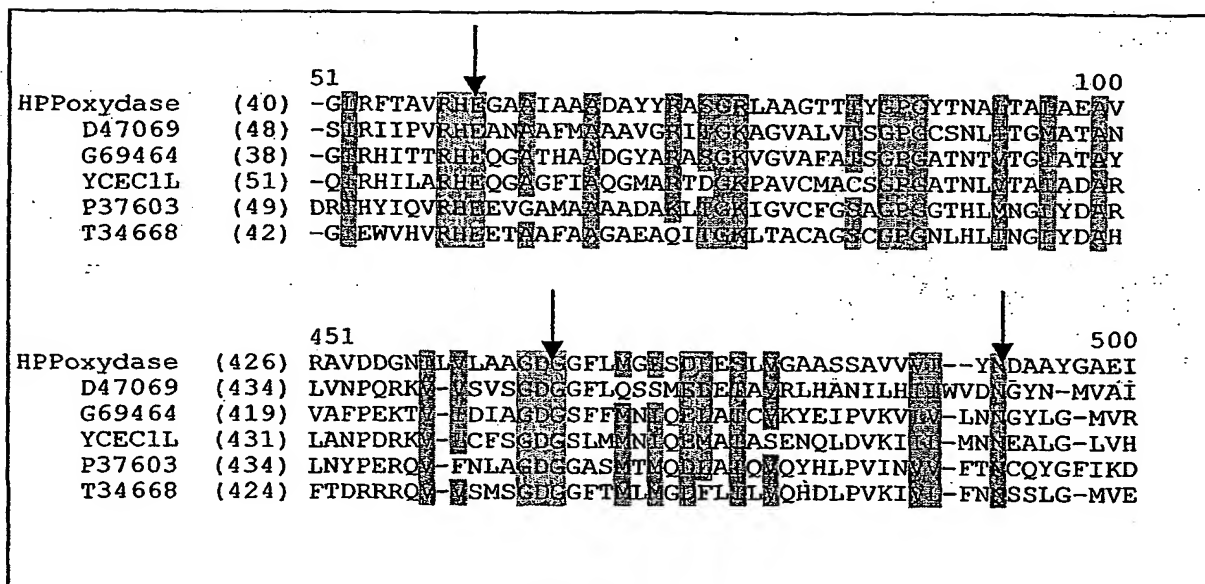


Figure 5

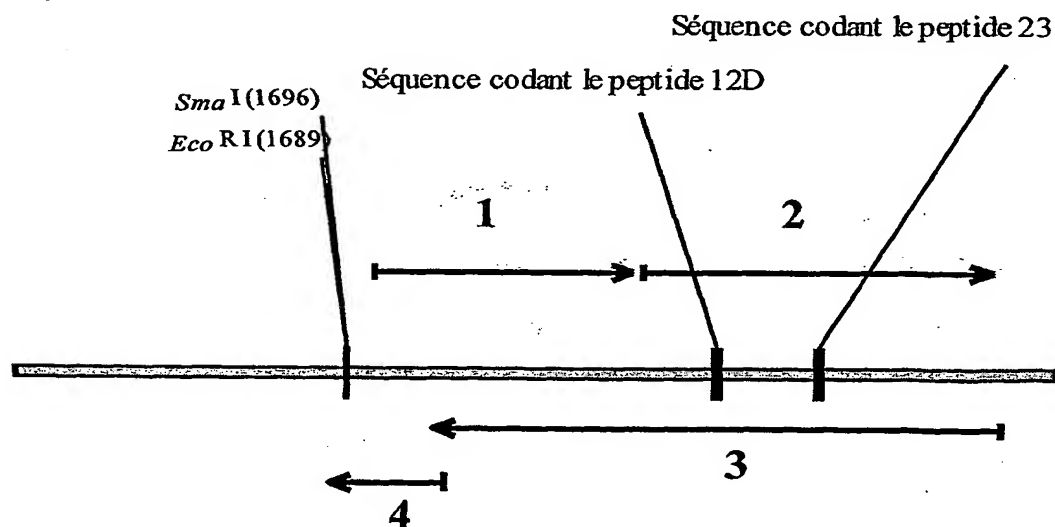


Figure 7

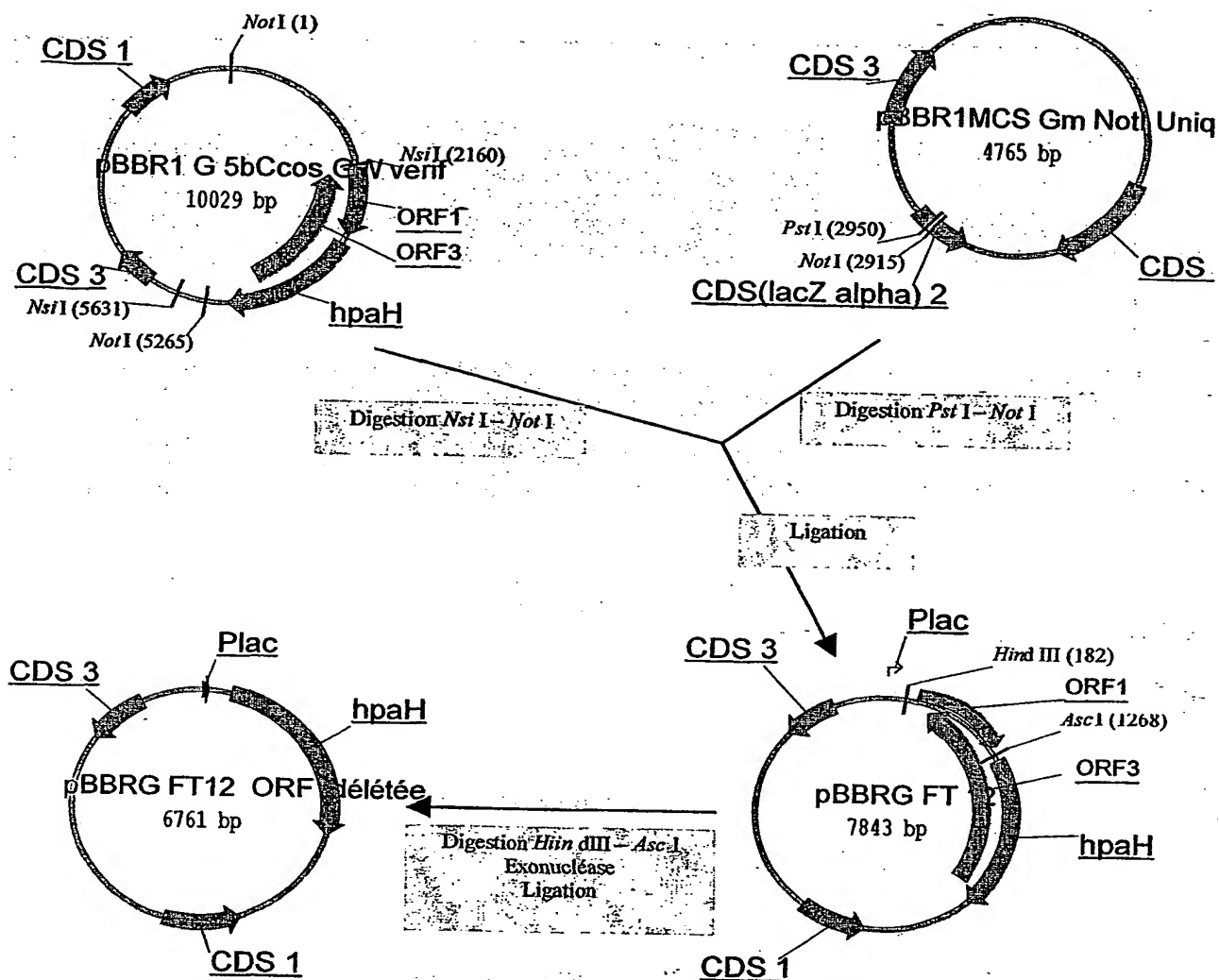


Figure 6

|          |                            |       |                                                    |     |
|----------|----------------------------|-------|----------------------------------------------------|-----|
| <b>A</b> | HPAH                       | (19)  | QSIHIPYERHADQDAGADTPARHPVIVVAGFVGTSLAIDTAQRFQRVVL  |     |
|          | hydroxylase - Q53657       | (1)   | -----VMAAGASTGLMLACEALGCAARVV                      |     |
|          | monooxygenase - Q9ZAM4     | (51)  | SRPIRFRIMSICERIGMLPCSEKKVIVVGGTCGLMLSIDSRRIIPSL    |     |
|          | putativ oxygenase - Q54171 | (1)   | -----MD--AS--VMAAGASTGLMLAGEFLAIVDIV               |     |
|          | MHPA ECOLI                 | (1)   | -----MAIQHPDIQPAVNHSVQVAPAGAGFVGMANYIGOMLIDVLV     |     |
|          | Oxygenase - O86481         | (1)   | -----MAD--PTR--VMAAGAGFVGTAAHEFARRRLRVRL           |     |
|          | Consensus                  | (51)  | -----GXGXKG                                        |     |
| <b>B</b> | HPAH                       | (152) | ALQLPLIDLRLWHSKTALEPQAEAGALLVET-PDGSYR-IDAQWTHACDG | 201 |
|          | hydroxylase - Q53657       | (107) | ARELG-VRIVRGSGTGFADQADGVTVETDT-G-----LLRARIYVGC    | 250 |
|          | monooxygenase - Q9ZAM4     | (201) | AEASELASVNYGWRVIDFEQGADGVSAIVEEAATGKQOKIRAEYVAGAG  |     |
|          | putativ oxygenase - Q54171 | (107) | ARELG-ADIRRGHEVTLHDHGDHVEAEVRG-PEDEKIRLTAPYVGC     |     |
|          | MHPA ECOLI                 | (127) | VSRFPNVRCLEFSRELEAFSQDDDEVTLHLKT-AEQREIVKAQWVACDG  |     |
|          | Oxygenase - O86481         | (117) | VARLG-VDVEWETRTTGFSDAEGVDVLEH-ADGTTESTRVVPWVGC     |     |
|          | Consensus                  | (201) | -----CDG                                           |     |
| <b>C</b> | HPAH                       | (288) | LLGKDAPFELEWASVYTFACLRMDRFVHGIVVFAGHSAGVSPFGARFAN  | 351 |
|          | hydroxylase - Q53657       | (230) | SDHGMHD--VTWLSRLTDVSRSLADSYRLGALLAGHAHHLHPAGGQELN  | 400 |
|          | monooxygenase - Q9ZAM4     | (348) | GMALDIEI-IDMGTVVAGHALYVEQMVSGAILGDAHLFTFAGGLAY     |     |
|          | putativ oxygenase - Q54171 | (244) | IDISHAEH--EWSAFGDATRLVTEYRRGALLGDAHLFTFAGGLAY      |     |
|          | MHPA ECOLI                 | (262) | PNPDNVEL--IRQVYTHNARLAQRFRIIDALLGDAHIMPVWQGOVYN    |     |
|          | Oxygenase - O86481         | (253) | VRQVRTP---TWTSVFTFQRMVPRMGEGVFAVGHAAVHSPASGRMN     |     |
|          | Consensus                  | (351) | -----GRVXXAGDAXH                                   |     |
| <b>D</b> | HPAH                       | (338) | SGVDAENTANKHDLRLQADASTAALYGALEYAADENI----RNSTR     | 401 |
|          | hydroxylase - Q53657       | (278) | LGFDVAVNGGWAADVVRHGTEEDNDGGRPIADGVV----RNTRT       | 450 |
|          | monooxygenase - Q9ZAM4     | (397) | TAVEDAVNIGKHAATLKEQAGPELASEFEFSKLAKRNTGYARGLADS    |     |
|          | putativ oxygenase - Q54171 | (292) | TGICDANNICWAAALRLTASESNDSSHSEHAVGERLM----MNTKA     |     |
|          | MHPA ECOLI                 | (310) | SGMRDAFNHAKKALTIQEKARDAEDLQOARDHAKAMI----DLSVT     |     |
|          | Oxygenase - O86481         | (300) | TGVOEAYSNAKALALAEHAERENDSLERVPIGERLL----GSTTK      |     |
|          | Consensus                  | (401) | -----DXXXLXWLXXXXXXXXXXLLXXYXER                    |     |

Figure 8

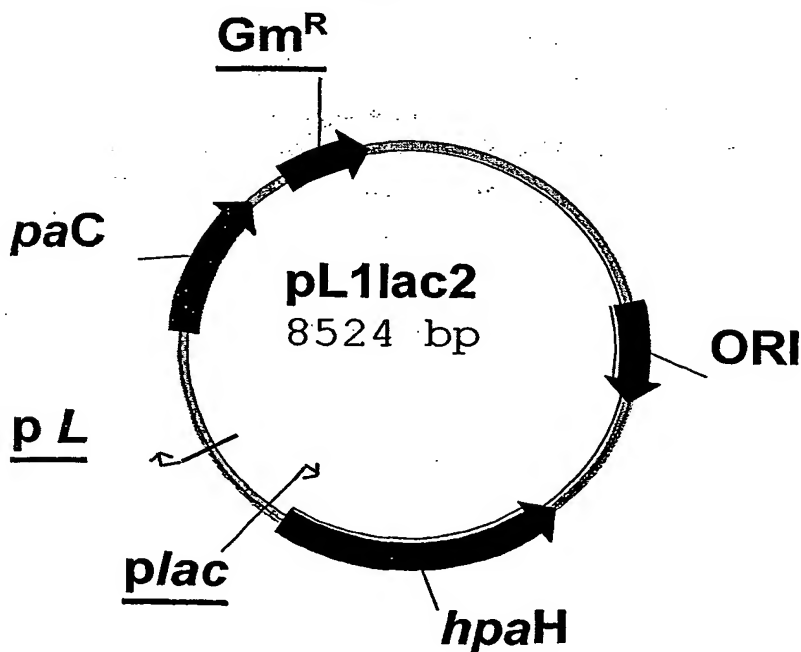


Figure 9

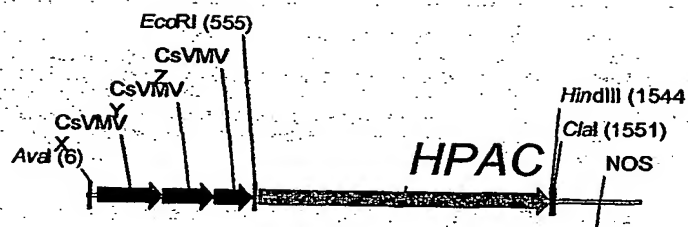


Figure 10

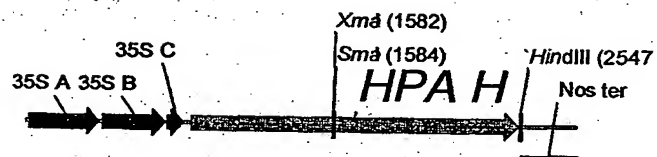


Figure 11

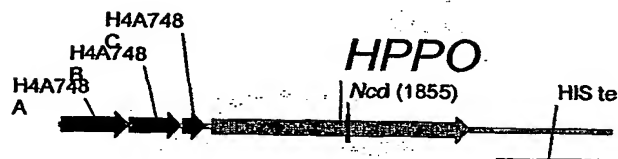


Figure 12

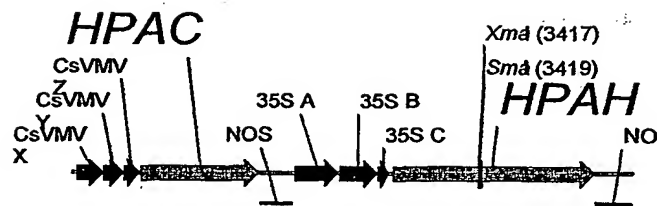


Figure 13

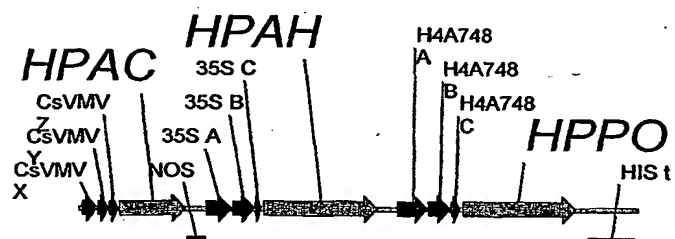


Figure 14

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; Aventis CropScience S.A.

<120> Plantes tolérantes aux herbicides par contournement de  
voie métabolique

&lt;130&gt; gènes du shunt

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 22

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1683

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arthrobacter globiformis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1683)

&lt;400&gt; 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| atg | act | tca | ctt | aca | gtg | tcc | ggc | cgg | gtg | gcg | cag | gtc | ctc | agc | agc | 48 |
| Met | Thr | Ser | Leu | Thr | Val | Ser | Gly | Arg | Val | Ala | Gln | Val | Leu | Ser | Ser |    |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |    |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| tat | gtc | agc | gat | gtg | ttc | ggt | gtg | atg | ggc | aac | gga | aac | gtc | tac | ttc | 96 |
| Tyr | Val | Ser | Asp | Val | Phe | Gly | Val | Met | Gly | Asn | Gly | Asn | Val | Tyr | Phe |    |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |    |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ctg | gac | gcc | gcc | gag | aag | gag | ggc | ctc | cgc | ttc | acg | gcc | gta | cgc | cat | 144 |
| Leu | Asp | Ala | Ala | Glu | Lys | Glu | Gly | Leu | Arg | Phe | Thr | Ala | Val | Arg | His |     |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| gaa | ggt | gcc | gcc | atc | gcg | gcg | gcg | gac | gcc | tac | tat | cgg | gca | tcc | ggg | 192 |
| Glu | Gly | Ala | Ala | Ile | Ala | Ala | Ala | Asp | Ala | Tyr | Tyr | Arg | Ala | Ser | Gly |     |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| cgc | ctg | gcg | gcg | ggg | acc | acc | acc | tac | ggc | ccc | ggt | tac | acc | aac | gcc | 240 |
| Arg | Leu | Ala | Ala | Gly | Thr | Thr | Thr | Tyr | Gly | Pro | Gly | Tyr | Thr | Asn | Ala |     |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ctg | acg | gcc | ctc | gcc | gag | gcg | gtc | cag | gcg | cag | atc | ccc | gtg | gtg | ctc | 288 |
| Leu | Thr | Ala | Leu | Ala | Glu | Ala | Val | Gln | Ala | Gln | Ile | Pro | Val | Val | Leu |     |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| gtc | acc | ggg | gac | gcc | ccg | agc | agc | ggc | gcc | cgg | cct | tgg | gac | gtg | gac | 336 |
| Val | Thr | Gly | Asp | Ala | Pro | Ser | Ser | Gly | Ala | Arg | Pro | Trp | Asp | Val | Asp |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| cag | gcc | gcg | atc | gcc | gcc | ggg | ctg | ggg | gcg | gcg | acc | ttc | acg | gtc | acc | 384 |
| Gln | Ala | Ala | Ile | Ala | Ala | Gly | Leu | Gly | Ala | Ala | Thr | Phe | Thr | Val | Thr |     |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| cgt | gaa | gcc | gca | ggc | tcc | atc | acg | cag | gaa | gcg | gtg | gag | tac | gca | ctt | 432 |
| Arg | Glu | Ala | Ala | Gly | Ser | Ile | Thr | Gln | Glu | Ala | Val | Glu | Tyr | Ala | Leu |     |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| gcc | cgg | cgg | acc | gcc | gtc | gtg | atc | gcc | gtt | cca | tac | gac | ctg | tcg | gcc | 480 |
| Ala | Arg | Arg | Thr | Ala | Val | Val | Ile | Ala | Val | Pro | Tyr | Asp | Leu | Ser | Ala |     |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ctt | gag | gcg | gcg | gag | gaa | gat | ctt | ccc | gtg | ccg | ccg | gcg | gcc | tcg | gtt | 528 |
| Leu | Glu | Ala | Ala | Glu | Glu | Asp | Leu | Pro | Val | Pro | Pro | Ala | Ala | Ser | Val |     |



| 165                                                                                                                                                   | 170 | 175 |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| ccg gac gcc atc ggc ggc gga ctc gga cgg gcg gcc gaa gtg cgg gcg<br>Pro Asp Ala Ile Gly Gly Gly Leu Gly Arg Ala Ala Glu Val Arg Ala<br>180 185 190     |     |     | 576  |
| gcc gaa ttg ctg gcg ggc gcg aag cgg ccg ctc atc ctt gcc ggc cgc<br>Ala Glu Leu Leu Ala Gly Ala Lys Arg Pro Leu Ile Leu Ala Gly Arg<br>195 200 205     |     |     | 624  |
| ggt gcg cac ctc gca gga gcc ggc ccc gaa ctc cgg gaa ctc gcc gac<br>Gly Ala His Leu Ala Gly Ala Gly Pro Glu Leu Arg Glu Leu Ala Asp<br>210 215 220     |     |     | 672  |
| cgc ctc ggc gcg ctc acg gcc ggc acc gca ctg gcg ctg aac ctg ctg<br>Arg Leu Gly Ala Leu Thr Ala Gly Thr Ala Leu Ala Leu Asn Leu Leu<br>225 230 235 240 |     |     | 720  |
| cag ggc gag ggg tac ctc ggc gtc gcg ggc ggc ttc ggc acg gat acc<br>Gln Gly Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ala Gly Gly Phe Gly Thr Asp Thr<br>245 250 255     |     |     | 768  |
| gcc gcc ggg ctc atg ggc gag gcg gac gtg gtg ctc gtg gcg gga gcc<br>Ala Ala Gly Leu Met Gly Glu Ala Asp Val Val Leu Val Ala Gly Ala<br>260 265 270     |     |     | 816  |
| agc ctg acc ccc ttc acc atg cgc ttc ggc cac ctg atc gcc ccg gac<br>Ser Leu Thr Pro Phe Thr Met Arg Phe Gly His Leu Ile Gly Pro Asp<br>275 280 285     |     |     | 864  |
| gcc acc gtg atc cag atc gac acc gcc atg gag ccg acg gac ccg cgg<br>Ala Thr Val Ile Gln Ile Asp Thr Ala Met Glu Pro Thr Asp Pro Arg<br>290 295 300     |     |     | 912  |
| gtg gac ctg ttt gtc agt gcg gac gcg aag gcc gct gcc ggc cgg atc<br>Val Asp Leu Phe Val Ser Ala Asp Ala Lys Ala Ala Ala Gly Arg Ile<br>305 310 315 320 |     |     | 960  |
| ctc cgg ctg ctg gat gac gcc gcc ggg gcc aat gcg tcg aag gcc tgg<br>Leu Arg Leu Leu Asp Asp Ala Ala Gly Ala Asn Ala Ser Lys Ala Trp<br>325 330 335     |     |     | 1008 |
| cgc gcg gaa gca ctc aag cgt ctg gcc gaa gga ccc tgc cac cac ccc<br>Arg Ala Glu Ala Leu Lys Arg Leu Ala Glu Gly Pro Cys His His Pro<br>340 345 350     |     |     | 1056 |
| ggc acc gca gag acc acg gac ggc cgc ctt gac ccc cgg gcg ctt gct<br>Gly Thr Ala Glu Thr Thr Asp Gly Arg Leu Asp Pro Arg Ala Leu Ala<br>355 360 365     |     |     | 1104 |
| tcg gca ctg gat gcc gtc ctg ccg gaa cgc cgc acc gtg gtc cag gac<br>Ser Ala Leu Asp Ala Val Leu Pro Glu Arg Arg Thr Val Val Gln Asp<br>370 375 380     |     |     | 1152 |
| ggc ggg cac ttc ctg ggc tgg gca ccc atg tac tgg cgc atc ccc cgt<br>Gly Gly His Phe Leu Gly Trp Ala Pro Met Tyr Trp Arg Ile Pro Arg<br>385 390 395 400 |     |     | 1200 |
| cct cag gac ctg gtc atg gtg ggg acc gcg tac cag tcg atc ggg ctt<br>Pro Gln Asp Leu Val Met Val Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Ile Gly Leu<br>405 410 415     |     |     | 1248 |
| ggc ctg gcc agc gcc gtg ggg gcg tcc cgg gcc gtg gac gac ggc aat<br>Gly Leu Ala Ser Ala Val Gly Ala Ser Arg Ala Val Asp Asp Gly Asn<br>420 425 430     |     |     | 1296 |
| atc ctg gtg ctg gcg gcg ggc gac ggc gga ttc ctg atg ggc ctg tcc<br>Ile Leu Val Leu Ala Ala Gly Asp Gly Gly Phe Leu Met Gly Leu Ser<br>435 440 445     |     |     | 1344 |

435                      440                      445  
 gac ctg gaa tgc ctc gtg ggc gcg gcg agc agc gcc gtc gtg gtg atc 1392  
 Asp Leu Glu Ser Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val Ile  
 450                      455                      460  
 tac aac gac gcc gcc tac ggg gcc gag atc cat cag tac gcc tca cgg 1440  
 Tyr Asn Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser Arg  
 465                      470                      475                      480  
 ggg ctc acc gaa aag ccc atg ctg atc ccc gaa gtg gac ttc agc ggg 1488  
 Gly Leu Thr Glu Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser Gly  
 485                      490                      495  
 att gcc cgc gcg atc ggg gcg gaa tcc gca atc atc cgc aag ctg tgc 1536  
 Ile Ala Arg Ala Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu Ser  
 500                      505                      510  
 gac ctc tcc gcg ctc acg gac tgg atc gag gcc gcc gcc agg gga acc 1584  
 Asp Leu Ser Ala Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly Thr  
 515                      520                      525  
 ttc gtg gcc gac tgc cgc atc acc tca agc gtc cgg gcc ccg tgg ctg 1632  
 Phe Val Ala Asp Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp Leu  
 530                      535                      540  
 agc gaa tgg atg agg gcc tgc caa gcg gcg aag gag gcg gtg gcg ggc 1680  
 Ser Glu Trp Met Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala Gly  
 545                      550                      555                      560  
 tag 1683

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 561

&lt;212&gt;

<213> *Arthrobacter globiformis*

&lt;400&gt; 2

Met Thr Ser Leu Thr Val Ser Gly Arg Val Ala Gln Val Leu Ser Ser  
 1                      5                      10                      15  
 Tyr Val Ser Asp Val Phe Gly Val Met Gly Asn Gly Asn Val Tyr Phe  
 20                      25                      30  
 Leu Asp Ala Ala Glu Lys Glu Gly Leu Arg Phe Thr Ala Val Arg His  
 35                      40                      45  
 Glu Gly Ala Ala Ile Ala Ala Ala Asp Ala Tyr Tyr Arg Ala Ser Gly  
 50                      55                      60  
 Arg Leu Ala Ala Gly Thr Thr Thr Tyr Gly Pro Gly Tyr Thr Asn Ala  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Thr Ala Leu Ala Glu Ala Val Gln Ala Gln Ile Pro Val Val Leu  
 85                      90                      95  
 Val Thr Gly Asp Ala Pro Ser Ser Gly Ala Arg Pro Trp Asp Val Asp  
 100                      105                      110  
 Gln Ala Ala Ile Ala Ala Gly Leu Gly Ala Ala Thr Phe Thr Val Thr  
 115                      120                      125  
 Arg Glu Ala Ala Gly Ser Ile Thr Gln Glu Ala Val Glu Tyr Ala Leu  
 130                      135                      140  
 Ala Arg Arg Thr Ala Val Val Ile Ala Val Pro Tyr Asp Leu Ser Ala

|             |                 |             |             |             |     |     |
|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-----|-----|
| 145         |                 | 150         |             | 155         |     | 160 |
| Leu Glu Ala | Ala Glu Glu Asp | Leu Pro Val | Pro Pro Ala | Ala Ala Ser | Val |     |
|             | 165             | 170         |             | 175         |     |     |
| Pro Asp Ala | Ile Gly Gly Gly | Leu Gly Arg | Ala Ala Glu | Val Arg Ala |     |     |
|             | 180             | 185         |             | 190         |     |     |
| Ala Glu Leu | Leu Ala Gly Ala | Lys Arg Pro | Leu Ile Leu | Ala Gly Arg |     |     |
|             | 195             | 200         |             | 205         |     |     |
| Gly Ala His | Leu Ala Gly Ala | Gly Pro Glu | Leu Arg Glu | Leu Ala Asp |     |     |
|             | 210             | 215         |             | 220         |     |     |
| Arg Leu Gly | Ala Leu Thr Ala | Gly Thr Ala | Leu Ala Leu | Asn Leu Leu |     |     |
|             | 225             | 230         |             | 235         |     | 240 |
| Gln Gly Glu | Gly Tyr Leu Gly | Val Ala Gly | Gly Gly Phe | Gly Thr Asp | Thr |     |
|             | 245             |             | 250         | 255         |     |     |
| Ala Ala Gly | Leu Met Gly Glu | Ala Asp Val | Val Leu Val | Ala Gly Ala |     |     |
|             | 260             | 265         |             | 270         |     |     |
| Ser Leu Thr | Pro Phe Thr Met | Arg Phe Gly | His Leu Ile | Gly Pro Asp |     |     |
|             | 275             | 280         |             | 285         |     |     |
| Ala Thr Val | Ile Gln Ile Asp | Thr Ala Met | Glu Pro Thr | Asp Pro Arg |     |     |
|             | 290             | 295         |             | 300         |     |     |
| Val Asp Leu | Phe Val Ser Ala | Asp Ala Lys | Ala Ala Ala | Gly Arg Ile |     |     |
|             | 305             | 310         |             | 315         |     | 320 |
| Leu Arg Leu | Leu Asp Asp Ala | Ala Gly Ala | Asn Ala Ser | Lys Ala Trp |     |     |
|             | 325             | 330         |             | 335         |     |     |
| Arg Ala Glu | Ala Leu Lys Arg | Leu Ala Glu | Gly Pro Cys | His His Pro |     |     |
|             | 340             | 345         |             | 350         |     |     |
| Gly Thr Ala | Glu Thr Thr Asp | Gly Arg Leu | Asp Pro Arg | Ala Leu Ala |     |     |
|             | 355             | 360         |             | 365         |     |     |
| Ser Ala Leu | Asp Ala Val Leu | Pro Glu Arg | Arg Thr Val | Val Gln Asp |     |     |
|             | 370             | 375         |             | 380         |     |     |
| Gly Gly His | Phe Leu Gly Trp | Ala Pro Met | Tyr Trp Arg | Ile Pro Arg |     |     |
|             | 385             | 390         |             | 395         |     | 400 |
| Pro Gln Asp | Leu Val Met Val | Gly Thr Ala | Tyr Gln Ser | Ile Gly Leu |     |     |
|             | 405             | 410         |             | 415         |     |     |
| Gly Leu Ala | Ser Ala Val Gly | Ala Ser Arg | Ala Val Asp | Asp Gly Asn |     |     |
|             | 420             | 425         |             | 430         |     |     |
| Ile Leu Val | Leu Ala Ala Gly | Asp Gly Gly | Phe Leu Met | Gly Leu Ser |     |     |
|             | 435             | 440         |             | 445         |     |     |
| Asp Leu Glu | Ser Leu Val Gly | Ala Ala Ser | Ser Ala Val | Val Val Ile |     |     |
|             | 450             | 455         |             | 460         |     |     |
| Tyr Asn Asp | Ala Ala Tyr Gly | Ala Glu Ile | His Gln Tyr | Gly Ser Arg |     |     |
|             | 465             | 470         |             | 475         |     | 480 |
| Gly Leu Thr | Glu Lys Pro Met | Leu Ile Pro | Glu Val Asp | Phe Ser Gly |     |     |
|             | 485             | 490         |             | 495         |     |     |
| Ile Ala Arg | Ala Ile Gly Ala | Glu Ser Ala | Ile Ile Arg | Lys Leu Ser |     |     |
|             | 500             | 505         |             | 510         |     |     |

Asp Leu Ser Ala Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly Thr  
515 520 525

Phe Val Ala Asp Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp Leu  
530 535 540

Ser Glu Trp Met Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala  
545 550 555 560

Gly

<210> 3

<211> 1944

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant  
d'HPPO d'A. globiformis

<220>

<221> CDS

<222> (55)..(1737)

<400> 3

ccgacgtcgc atgctcccgg cgcgcattggc ggccgcggga attcgattga attc atg 57  
Met  
1

act tca ctt aca gtg tcc ggc cgg gtg gcg cag gtc ctc agc agc tat 105  
Thr Ser Leu Thr Val Ser Gly Arg Val Ala Gln Val Leu Ser Ser Tyr  
5 10 15

gtc agc gat gtg ttc ggt gtg atg ggc aac gga aac gtc tac ttc ctg 153  
Val Ser Asp Val Phe Gly Val Met Gly Asn Gly Asn Val Tyr Phe Leu  
20 25 30

gac gcc gcc gag aag gag ggc ctc cgc ttc acg gcc gta cgc cat gaa 201  
Asp Ala Ala Glu Lys Glu Gly Leu Arg Phe Thr Ala Val Arg His Glu  
35 40 45

ggt gcc gcc atc gcg gcg gcg gac gcc tac tat cgg gca tcc ggg cgc 249  
Gly Ala Ala Ile Ala Ala Asp Ala Tyr Tyr Arg Ala Ser Gly Arg  
50 55 60 65

ctg gcg gcg ggg acc acc acc tac ggc ccc ggt tac acc aac gcc ctg 297  
Leu Ala Ala Gly Thr Thr Thr Tyr Gly Pro Gly Tyr Thr Asn Ala Leu  
70 75 80

acg gcc ctc gcc gag gcg gtc cag gcg cag atc ccc gtg gtg ctc gtc 345  
Thr Ala Leu Ala Glu Ala Val Gln Ala Gln Ile Pro Val Val Leu Val  
85 90 95

acc ggg gac gcc ccg agc agc ggc gcc cgg cct tgg gac gtg gac cag 393  
Thr Gly Asp Ala Pro Ser Ser Gly Ala Arg Pro Trp Asp Val Asp Gln  
100 105 110

gcc gcg atc gcc gcc ggg ctg ggg gcg gcg acc ttc acg gtc acc cgt 441  
Ala Ala Ile Ala Ala Gly Leu Gly Ala Ala Thr Phe Thr Val Thr Arg  
115 120 125

gaa gcc gca ggc tcc atc acg cag gaa gcg gtg gag tac gca ctt gcc 489  
Glu Ala Ala Gly Ser Ile Thr Gln Glu Ala Val Glu Tyr Ala Leu Ala  
130 135 140 145

cgg cgg acc gcc gtc gtg atc gcc gtt cca tac gac ctg tcg gcc ctt 537  
Arg Arg Thr Ala Val Val Ile Ala Val Pro Tyr Asp Leu Ser Ala Leu

| 150 |     |     |       |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     |     | 160 |     |      |  |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|--|--|--|--|
| gag | gcg | gcg | gag   | gaa | gat | ctt | ccc | gtg | ccg | ccg | gcg | gcc | tcg | ggt | ccg | 585  |  |  |  |  |  |
| Glu | Ala | Ala | Glu   | Glu | Asp | Leu | Pro | Val | Pro | Pro | Ala | Ala | Ser | Val | Pro |      |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 165   |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |      |  |  |  |  |  |
| gac | gcc | atc | ggc   | ggc | gga | ctc | gga | cgg | gcg | gcc | gaa | gtg | cgg | gcg | gcc | 633  |  |  |  |  |  |
| Asp | Ala | Ile | Gly   | Gly | Gly | Leu | Gly | Arg | Ala | Ala | Glu | Val | Arg | Ala | Ala |      |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 180   |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |      |  |  |  |  |  |
| gaa | ttg | ctg | gcg   | ggc | gcg | aag | cgg | ccg | ctc | atc | ctt | gcc | ggc | cgc | ggt | 681  |  |  |  |  |  |
| Glu | Leu | Leu | Ala   | Gly | Ala | Lys | Arg | Pro | Leu | Ile | Leu | Ala | Gly | Arg | Gly |      |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 195   |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |      |  |  |  |  |  |
| gcg | cac | ctc | gca   | gga | acc | ggc | ccc | gaa | ctc | cgg | gaa | ctc | gcc | gac | cgc | 729  |  |  |  |  |  |
| Ala | His | Leu | Ala   | Gly | Thr | Gly | Pro | Glu | Leu | Arg | Glu | Leu | Ala | Asp | Arg |      |  |  |  |  |  |
| 210 |     |     |       | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     | 225 |     |      |  |  |  |  |  |
| ctc | ggc | gcg | ctc   | acg | gcc | ggc | acc | gca | ctg | gcg | ctg | aac | ctg | ctg | cag | 777  |  |  |  |  |  |
| Leu | Gly | Ala | Leu   | Thr | Ala | Gly | Thr | Ala | Leu | Ala | Leu | Asn | Leu | Leu | Gln |      |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 230   |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |     |      |  |  |  |  |  |
| ggc | gag | ggg | tac   | ctc | ggc | gtc | gcg | ggc | ggc | ttc | ggc | acg | gat | acc | gcc | 825  |  |  |  |  |  |
| Gly | Glu | Gly | Tyr   | Leu | Gly | Val | Ala | Gly | Gly | Phe | Gly | Thr | Asp | Thr | Ala |      |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 245   |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |     |      |  |  |  |  |  |
| gcc | ggg | ctc | atg   | ggc | gag | gcg | gac | gtg | gtg | ctc | gtg | gcg | gga | gcc | agc | 873  |  |  |  |  |  |
| Ala | Gly | Leu | Met   | Gly | Glu | Ala | Asp | Val | Val | Leu | Val | Ala | Gly | Ala | Ser |      |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 260   |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |      |  |  |  |  |  |
| ctg | acc | ccc | ttc   | acc | atg | cgc | ttc | ggc | cac | ctg | atc | ggc | ccg | gac | gcc | 921  |  |  |  |  |  |
| Leu | Thr | Pro | Phe   | Thr | Met | Arg | Phe | Gly | His | Leu | Ile | Gly | Pro | Asp | Ala |      |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 275   |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |      |  |  |  |  |  |
| acc | gtg | atc | cag   | atc | gac | acc | gcc | atg | gag | ccg | acg | gac | ccg | cgg | gtg | 969  |  |  |  |  |  |
| Thr | Val | Ile | Gln   | Ile | Asp | Thr | Ala | Met | Glu | Pro | Thr | Asp | Pro | Arg | Val |      |  |  |  |  |  |
| 290 |     |     |       | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     | 305 |     |      |  |  |  |  |  |
| gac | ctg | ttt | gtc   | agt | gcg | gac | gcg | aag | gcc | gct | gcc | ggc | cgg | atc | ctc | 1017 |  |  |  |  |  |
| Asp | Leu | Phe | Val   | Ser | Ala | Asp | Ala | Lys | Ala | Ala | Ala | Gly | Arg | Ile | Leu |      |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 310   |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |     |      |  |  |  |  |  |
| cgg | ctg | ctg | gat   | gac | gcc | gcc | ggg | gcc | aat | gcg | tcg | aag | gcc | tgg | cgc | 1065 |  |  |  |  |  |
| Arg | Leu | Leu | Asp   | Asp | Ala | Ala | Gly | Ala | Asn | Ala | Ser | Lys | Ala | Trp | Arg |      |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 325   |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |     |      |  |  |  |  |  |
| gcg | gaa | gca | ctc   | aag | cgt | ctg | gcc | gaa | gga | ccc | tgc | cac | cac | ccc | ggc | 1113 |  |  |  |  |  |
| Ala | Glu | Ala | Leu   | Lys | Arg | Leu | Ala | Glu | Gly | Pro | Cys | His | His | Pro | Gly |      |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 340   |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |     |      |  |  |  |  |  |
| acc | gca | gag | acc   | acg | gac | ggc | cgc | ctt | gac | ccc | cgg | gcg | ctt | gct | tcg | 1161 |  |  |  |  |  |
| Thr | Ala | Glu | Thr   | Thr | Asp | Gly | Arg | Leu | Asp | Pro | Arg | Ala | Leu | Ala | Ser |      |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 355   |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |  |  |  |  |  |
| gca | ctg | gat | gcc</ |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |  |  |

420 425 430

ctg gtg ctg gcg gcg ggc gac ggc gga ttc ctg atg ggc ctg tcc gac 1401  
 Leu Val Leu Ala Ala Gly Asp Gly Gly Phe Leu Met Gly Leu Ser Asp  
 435 440 445

ctg gaa tcg ctc gtg ggc gcg gcg agc agc gcc gtc gtg gtg atc tac 1449  
 Leu Glu Ser Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val Ile Tyr  
 450 455 460 465

aac gac gcc gcc tac ggg gcc gag atc cat cag tac ggc tca cgg ggg 1497  
 Asn Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser Arg Gly  
 470 475 480

ctc acc gaa aag ccc atg ctg atc ccc gaa gtg gac ttc agc ggg att 1545  
 Leu Thr Glu Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser Gly Ile  
 485 490 495

gcc cgc gcg atc ggg gcg gaa tcc gca atc atc cgc aag ctg tcg gac 1593  
 Ala Arg Ala Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu Ser Asp  
 500 505 510

ctc tcc gcg ctc acg gac tgg atc gag gcc ggc gcc agg gga acc ttc 1641  
 Leu Ser Ala Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly Thr Phe  
 515 520 525

gtg gcc gac tgc cgc atc acc tca agc gtc cgg gcc ccg tgg ctg agc 1689  
 Val Ala Asp Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp Leu Ser  
 530 535 540 545

gaa tgg atg agg gcc tcg caa gcg gcg aag gag gcg gtg gcg ggc tag 1737  
 Glu Trp Met Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala Gly  
 550 555 560

ggccggcctc gtcgaaatgc cgccctccaa cccaactcag taccagctca gggcggttctc 1797

agggctggga acgccctgag ctgctactca tttgttcgaa ctcgagaatt caatcactag 1857

tgaattcgcg gccgctgca ggtcgaccat atgggagagc tcccaacgcy ttggatgcat 1917

agcttgagta ttctatagtg tcaccta 1944

<210> 4  
 <211> 561  
 <212>  
 <213> Séquence artificielle  
 <223> Description de la séquence artificielle: mutant  
 d'HPPO d'A. globiformis

<400> 4  
 Met Thr Ser Leu Thr Val Ser Gly Arg Val Ala Gln Val Leu Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Tyr Val Ser Asp Val Phe Gly Val Met Gly Asn Gly Asn Val Tyr Phe  
 20 25 30  
 Leu Asp Ala Ala Glu Lys Glu Gly Leu Arg Phe Thr Ala Val Arg His  
 35 40 45  
 Glu Gly Ala Ala Ile Ala Ala Ala Asp Ala Tyr Tyr Arg Ala Ser Gly  
 50 55 60  
 Arg Leu Ala Ala Gly Thr Thr Thr Tyr Gly Pro Gly Tyr Thr Asn Ala  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Ala Leu Ala Glu Ala Val Gln Ala Gln Ile Pro Val Val Leu  
 85 90 95

Val Thr Gly Asp Ala Pro Ser Ser Gly Ala Arg Pro Trp Asp Val Asp  
 100 105 110  
 Gln Ala Ala Ile Ala Ala Gly Leu Gly Ala Ala Thr Phe Thr Val Thr  
 115 120 125  
 Arg Glu Ala Ala Gly Ser Ile Thr Gln Glu Ala Val Glu Tyr Ala Leu  
 130 135 140  
 Ala Arg Arg Thr Ala Val Val Ile Ala Val Pro Tyr Asp Leu Ser Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Glu Ala Ala Glu Glu Asp Leu Pro Val Pro Pro Ala Ala Ser Val  
 165 170 175  
 Pro Asp Ala Ile Gly Gly Gly Leu Gly Arg Ala Ala Glu Val Arg Ala  
 180 185 190  
 Ala Glu Leu Leu Ala Gly Ala Lys Arg Pro Leu Ile Leu Ala Gly Arg  
 195 200 205  
 Gly Ala His Leu Ala Gly Thr Gly Pro Glu Leu Arg Glu Leu Ala Asp  
 210 215 220  
 Arg Leu Gly Ala Leu Thr Ala Gly Thr Ala Leu Ala Leu Asn Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Gln Gly Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ala Gly Gly Phe Gly Thr Asp Thr  
 245 250 255  
 Ala Ala Gly Leu Met Gly Glu Ala Asp Val Val Leu Val Ala Gly Ala  
 260 265 270  
 Ser Leu Thr Pro Phe Thr Met Arg Phe Gly His Leu Ile Gly Pro Asp  
 275 280 285  
 Ala Thr Val Ile Gln Ile Asp Thr Ala Met Glu Pro Thr Asp Pro Arg  
 290 295 300  
 Val Asp Leu Phe Val Ser Ala Asp Ala Lys Ala Ala Ala Gly Arg Ile  
 305 310 315 320  
 Leu Arg Leu Leu Asp Asp Ala Ala Gly Ala Asn Ala Ser Lys Ala Trp  
 325 330 335  
 Arg Ala Glu Ala Leu Lys Arg Leu Ala Glu Gly Pro Cys His His Pro  
 340 345 350  
 Gly Thr Ala Glu Thr Thr Asp Gly Arg Leu Asp Pro Arg Ala Leu Ala  
 355 360 365  
 Ser Ala Leu Asp Ala Val Leu Pro Glu Arg Arg Thr Val Val Gln Asp  
 370 375 380  
 Gly Gly His Phe Leu Gly Trp Ala Pro Met Tyr Trp Arg Ile Pro Arg  
 385 390 395 400  
 Pro Gln Asp Leu Val Met Val Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Ile Gly Leu  
 405 410 415  
 Gly Leu Ala Ser Ala Val Gly Ala Ser Arg Ala Val Asp Asp Gly Asn  
 420 425 430  
 Ile Leu Val Leu Ala Ala Gly Asp Gly Gly Phe Leu Met Gly Leu Ser  
 435 440 445  
 Asp Leu Glu Ser Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val Ile

450 455 460

Tyr Asn Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser Arg  
465 470 475 480

Gly Leu Thr Glu Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser Gly  
485 490 495

Ile Ala Arg Ala Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu Ser  
500 505 510

Asp Leu Ser Ala Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly Thr  
515 520 525

Phe Val Ala Asp Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp Leu  
530 535 540

Ser Glu Trp Met Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala Gly  
545 550 555 560

<210> 5  
<211> 1962  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: mutant  
d'HPPO d'A. globiformis

<220>  
<221> CDS  
<222> (111)..(1793)

<400> 5  
aggtgacact atagaatact caagctatgc atccaacgcg ttgggagctc tcccatatgg 60  
tcgacctgca ggcggccgcg aattcactag tgattggaag gatccggtgc atg act 116  
Met Thr  
1

tca ctt aca gtg tcc ggc cgg gtg gcg cag gtc ctc agc agc tat gtc 164  
Ser Leu Thr Val Ser Gly Arg Val Ala Gln Val Leu Ser Ser Tyr Val  
5 10 15

agc gat gtg ttc ggt gtg atg ggc aac gga aac gtc tac ttc ctg gac 212  
Ser Asp Val Phe Gly Val Met Gly Asn Gly Asn Val Tyr Phe Leu Asp  
20 25 30

gcc gcc gag aag gag ggc ctc cgc ttc acg gcc gta cgc cat gaa ggt 260  
Ala Ala Glu Lys Glu Gly Leu Arg Phe Thr Ala Val Arg His Glu Gly  
35 40 45 50

gcc gcc atc gcg gcg gcg gac gcc tac tat cgg gca tcc ggg cgc ctg 308  
Ala Ala Ile Ala Ala Ala Asp Ala Tyr Tyr Arg Ala Ser Gly Arg Leu  
55 60 65

gcg gcg ggg acc acc acc tac gcc ccc ggt tac acc aac gcc ctg acg 356  
Ala Ala Gly Thr Thr Thr Tyr Gly Pro Gly Tyr Thr Asn Ala Leu Thr  
70 75 80

gcc ctc gcc gag gcg gtc cag gcg cag atc ccc gtg gtg ctc gtc acc 404  
Ala Leu Ala Glu Ala Val Gln Ala Gln Ile Pro Val Val Leu Val Thr  
85 90 95

ggg gac gcc ccg agc agc ggc gcc cgg cct tgg gac gtg gac cag gcc 452



|            |     |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |      |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|------|
| Gly<br>100 | Asp | Ala | Pro | Ser | Ser | Gly<br>105 | Ala | Arg | Pro | Trp | Asp<br>110 | Val | Asp | Gln | Ala |      |
| gcg        | atc | gcc | ggc | ggg | ctg | ggg        | gcg | gcg | acc | ttc | acg        | gtc | acc | cgt | gaa | 500  |
| Ala        | Ile | Ala | Gly | Gly | Leu | Gly        | Ala | Ala | Thr | Phe | Thr        | Val | Thr | Arg | Glu | 130  |
| 115        |     |     |     |     | 120 |            |     |     |     | 125 |            |     |     |     |     |      |
| gcc        | gca | ggc | tcc | atc | acg | cag        | gaa | gcg | gtg | gag | tac        | gca | ctt | gcc | cgg | 548  |
| Ala        | Ala | Gly | Ser | Ile | Thr | Gln        | Glu | Ala | Val | Glu | Tyr        | Ala | Leu | Ala | Arg |      |
|            |     |     |     | 135 |     |            |     |     | 140 |     |            |     |     | 145 |     |      |
| cgg        | acc | gcc | gtc | gtg | atc | gcc        | gtt | cca | tac | gac | ctg        | tcg | gcc | ctt | gag | 596  |
| Arg        | Thr | Ala | Val | Val | Ile | Ala        | Val | Pro | Tyr | Asp | Leu        | Ser | Ala | Leu | Glu |      |
|            |     |     | 150 |     |     |            |     | 155 |     |     |            |     | 160 |     |     |      |
| gcg        | gca | gag | gaa | gat | ctt | ccc        | gtg | ccg | ccg | gcg | gcc        | tcg | gtt | ccg | gac | 644  |
| Ala        | Ala | Glu | Glu | Asp | Leu | Pro        | Val | Pro | Pro | Ala | Ala        | Ser | Val | Pro | Asp |      |
|            |     | 165 |     |     |     |            | 170 |     |     |     |            | 175 |     |     |     |      |
| gcc        | atc | ggc | ggc | gga | ctc | gga        | cgg | gcg | gcc | gaa | gtg        | cgg | gcg | gcc | gaa | 692  |
| Ala        | Ile | Gly | Gly | Gly | Leu | Gly        | Arg | Ala | Ala | Glu | Val        | Arg | Ala | Ala | Glu |      |
|            | 180 |     |     |     |     | 185        |     |     |     |     | 190        |     |     |     |     |      |
| ttg        | ctg | gcg | ggc | gcg | aag | cgg        | ccg | ctc | atc | ctt | gcc        | ggc | cgc | ggt | gcg | 740  |
| Leu        | Leu | Ala | Gly | Ala | Lys | Arg        | Pro | Leu | Ile | Leu | Ala        | Gly | Arg | Gly | Ala |      |
| 195        |     |     |     |     | 200 |            |     |     |     | 205 |            |     |     |     | 210 |      |
| cac        | ctc | gca | gga | gcc | ggc | ccc        | gaa | ctc | cgg | gaa | ctc        | gcc | gac | cgc | ctc | 788  |
| His        | Leu | Ala | Gly | Ala | Gly | Pro        | Glu | Leu | Arg | Glu | Leu        | Ala | Asp | Arg | Leu |      |
|            |     |     |     | 215 |     |            |     |     | 220 |     |            |     |     | 225 |     |      |
| ggc        | gcg | ctc | acg | gcc | ggc | acc        | gca | ctg | gcg | ctg | aac        | ctg | ctg | cag | ggc | 836  |
| Gly        | Ala | Leu | Thr | Ala | Gly | Thr        | Ala | Leu | Ala | Leu | Asn        | Leu | Leu | Gln | Gly |      |
|            |     |     | 230 |     |     |            |     | 235 |     |     |            |     | 240 |     |     |      |
| gag        | ggg | tac | ctc | ggc | gtc | gcg        | ggc | ggc | ttc | ggc | acg        | gat | acc | gcc | gcc | 884  |
| Glu        | Gly | Tyr | Leu | Gly | Val | Ala        | Gly | Gly | Phe | Gly | Thr        | Asp | Thr | Ala | Ala |      |
|            |     | 245 |     |     |     |            | 250 |     |     |     |            | 255 |     |     |     |      |
| ggg        | ctc | atg | ggc | gag | gcg | gac        | gtg | gtg | ctc | gtg | gcg        | gga | gcc | agc | ctg | 932  |
| Gly        | Leu | Met | Gly | Glu | Ala | Asp        | Val | Val | Leu | Val | Ala        | Gly | Ala | Ser | Leu |      |
|            | 260 |     |     |     |     | 265        |     |     |     |     | 270        |     |     |     |     |      |
| acc        | ccc | ttc | acc | atg | cgc | ttc        | ggc | cac | ctg | atc | ggc        | ccg | gac | gcc | acc | 980  |
| Thr        | Pro | Phe | Thr | Met | Arg | Phe        | Gly | His | Leu | Ile | Gly        | Pro | Asp | Ala | Thr |      |
| 275        |     |     |     |     | 280 |            |     |     |     | 285 |            |     |     |     | 290 |      |
| gtg        | atc | cag | atc | gac | acc | gcc        | atg | gag | ccg | acg | gac        | ccg | cgg | gtg | gac | 1028 |
| Val        | Ile | Gln | Ile | Asp | Thr | Ala        | Met | Glu | Pro | Thr | Asp        | Pro | Arg | Val | Asp |      |
|            |     |     |     | 295 |     |            |     |     | 300 |     |            |     |     | 305 |     |      |
| ctg        | ttt | gtc | agt | gcg | gac | gcg        | aag | gcc | gct | gcc | ggc        | cgg | atc | ctc | cgg | 1076 |
| Leu        | Phe | Val | Ser | Ala | Asp | Ala        | Lys | Ala | Ala | Ala | Gly        | Arg | Ile | Leu | Arg |      |
|            |     |     | 310 |     |     |            |     | 315 |     |     |            |     | 320 |     |     |      |
| ctg        | ctg | gat | gac | gcc | gcc | ggg        | gcc | aat | gcg | tcg | aag        | gcc | tgg | cgc | gcg | 1124 |
| Leu        | Leu | Asp | Asp | Ala | Ala | Gly        | Ala | Asn | Ala | Ser | Lys        | Ala | Trp | Arg | Ala |      |
|            |     | 325 |     |     |     |            | 330 |     |     |     |            | 335 |     |     |     |      |
| gaa        | gca | ctc | aag | cgt | ctg | gcc        | gaa | gga | ccc | tgc | cac        | cac | ccc | ggc | acc | 1172 |
| Glu        | Ala | Leu | Lys | Arg | Leu | Ala        | Glu | Gly | Pro | Cys | His        | His | Pro | Gly | Thr |      |
|            |     | 340 |     |     |     | 345        |     |     |     |     | 350        |     |     |     |     |      |
| gca        | gag | acc | acg | gac | ggc | cgc        | ctt | gac | ccc | cgg | gcg        | ctt | gct | tcg | gca | 1220 |
| Ala        | Glu | Thr | Thr | Asp | Gly | Arg        | Leu | Asp | Pro | Arg | Ala        | Leu | Ala | Ser | Ala |      |
| 355        |     |     |     |     | 360 |            |     |     |     | 365 |            |     |     |     | 370 |      |
| ctg        | gat | gcc | gtc | ctg | ccg | gaa        | cgc | cgc | acc | gtg | gtc        | cag | gac | ggc | ggg | 1268 |

Leu Asp Ala Val Leu Pro Glu Arg Arg Thr Val Val Gln Asp Gly Gly 375 380 385  
 cac ttc ctg ggc tgg gca ccc atg tac tgg cgc atc ccc cgt cct cag 1316  
 His Phe Leu Gly Trp Ala Pro Met Tyr Trp Arg Ile Pro Arg Pro Gln 390 395 400  
 gac ctg gtc atg gtg ggg acc gcg tac cag tgc atc ggg ctt ggc ctg 1364  
 Asp Leu Val Met Val Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Ile Gly Leu Gly Leu 405 410 415  
 gcc agc gcc gtg ggg gcg tcc cgg gcc gtg gac gac ggc aat atc ctg 1412  
 Ala Ser Ala Val Gly Ala Ser Arg Ala Val Asp Asp Gly Asn Ile Leu 420 425 430  
 gtg ctg gcg gcg ggc gac gcc gga ttc ctg atg gcc ctg tcc gac ctg 1460  
 Val Leu Ala Ala Gly Asp Gly Gly Phe Leu Met Gly Leu Ser Asp Leu 435 440 445 450  
 gaa tgc ctc gtg ggc gcg gcg agc agc gcc gtc gtg gtg atc tac aac 1508  
 Glu Ser Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val Ile Tyr Asn 455 460 465  
 gat gcc gcc tac ggg gcc gag atc cat cag tac ggc tca cgg ggg ctc 1556  
 Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser Arg Gly Leu 470 475 480  
 acc gaa aag ccc atg ctg atc ccc gaa gtg gac ttc agc ggg att gcc 1604  
 Thr Glu Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser Gly Ile Ala 485 490 495  
 cgc gcg atc ggg gcg gaa tcc gca atc atc cgc aag ctg tgc gac ctc 1652  
 Arg Ala Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu Ser Asp Leu 500 505 510  
 tcc gcg ctc acg gac tgg atc gag gcc gcc ggc gcc agg gga acc ttc gtg 1700  
 Ser Ala Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly Thr Phe Val 515 520 525 530  
 gcc gac tgc cgc atc acc tca agc gtc cgg gcc ccg tgg ctg agc gaa 1748  
 Ala Asp Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp Leu Ser Glu 535 540 545  
 tgg atg agg gcc tgc caa gcg gcg aag gag gcg gtg gcg ggc tag 1793  
 Trp Met Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala Gly 550 555 560  
 ggccggcctc gtcgaaatgc cgccctccaa cccaactcag taccagctca gggcggttctc 1853  
 agggctggga acgacctgag ctgctactca gtttggtcga actcgagaat tcaatcgaat 1913  
 tcccgcggcc gccatggcgg ccgggagcat gcgacgtcgg gccattcg 1962  
 <210> 6  
 <211> 541  
 <212>  
 <213> Séquence artificielle  
 <223> Description de la séquence artificielle: mutant  
 d'HPPO d'A. globiformis  
 <400> 6  
 Val Phe Gly Val Met Gly Asn Gly Asn Val Tyr Phe Leu Asp Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Glu Gly Leu Arg Phe Thr Ala Val Arg His Glu Gly Ala Ala  
 20 25 30

Ile Ala Ala Ala Asp Ala Tyr Tyr Arg Ala Ser Gly Arg Leu Ala Ala  
 35 40 45  
 Gly Thr Thr Thr Tyr Gly Pro Gly Tyr Thr Asn Ala Leu Thr Ala Leu  
 50 55 60  
 Ala Glu Ala Val Gln Ala Gln Ile Pro Val Val Leu Val Thr Gly Asp  
 65 70 75 80  
 Ala Pro Ser Ser Gly Ala Arg Pro Trp Asp Val Asp Gln Ala Ala Ile  
 85 90 95  
 Ala Gly Gly Leu Gly Ala Ala Thr Phe Thr Val Thr Arg Glu Ala Ala  
 100 105 110  
 Gly Ser Ile Thr Gln Glu Ala Val Glu Tyr Ala Leu Ala Arg Arg Thr  
 115 120 125  
 Ala Val Val Ile Ala Val Pro Tyr Asp Leu Ser Ala Leu Glu Ala Ala  
 130 135 140  
 Glu Glu Asp Leu Pro Val Pro Pro Ala Ala Ser Val Pro Asp Ala Ile  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Gly Leu Gly Arg Ala Ala Glu Val Arg Ala Ala Glu Leu Leu  
 165 170 175  
 Ala Gly Ala Lys Arg Pro Leu Ile Leu Ala Gly Arg Gly Ala His Leu  
 180 185 190  
 Ala Gly Ala Gly Pro Glu Leu Arg Glu Leu Ala Asp Arg Leu Gly Ala  
 195 200 205  
 Leu Thr Ala Gly Thr Ala Leu Ala Leu Asn Leu Leu Gln Gly Glu Gly  
 210 215 220  
 Tyr Leu Gly Val Ala Gly Gly Phe Gly Thr Asp Thr Ala Ala Gly Leu  
 225 230 235 240  
 Met Gly Glu Ala Asp Val Val Leu Val Ala Gly Ala Ser Leu Thr Pro  
 245 250 255  
 Phe Thr Met Arg Phe Gly His Leu Ile Gly Pro Asp Ala Thr Val Ile  
 260 265 270  
 Gln Ile Asp Thr Ala Met Glu Pro Thr Asp Pro Arg Val Asp Leu Phe  
 275 280 285  
 Val Ser Ala Asp Ala Lys Ala Ala Ala Gly Arg Ile Leu Arg Leu Leu  
 290 295 300  
 Asp Asp Ala Ala Gly Ala Asn Ala Ser Lys Ala Trp Arg Ala Glu Ala  
 305 310 315 320  
 Leu Lys Arg Leu Ala Glu Gly Pro Cys His His Pro Gly Thr Ala Glu  
 325 330 335  
 Thr Thr Asp Gly Arg Leu Asp Pro Arg Ala Leu Ala Ser Ala Leu Asp  
 340 345 350  
 Ala Val Leu Pro Glu Arg Arg Thr Val Val Gln Asp Gly Gly His Phe  
 355 360 365  
 Leu Gly Trp Ala Pro Met Tyr Trp Arg Ile Pro Arg Pro Gln Asp Leu  
 370 375 380  
 Val Met Val Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Ile Gly Leu Gly Leu Ala Ser  
 385 390 395 400

Ala Val Gly Ala Ser Arg Ala Val Asp Asp Gly Asn Ile Leu Val Leu  
 405 410 415  
 Ala Ala Gly Asp Gly Gly Phe Leu Met Gly Leu Ser Asp Leu Glu Ser  
 420 425 430  
 Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val Ile Tyr Asn Asp Ala  
 435 440 445  
 Ala Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser Arg Gly Leu Thr Glu  
 450 455 460  
 Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser Gly Ile Ala Arg Ala  
 465 470 475 480  
 Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu Ser Asp Leu Ser Ala  
 485 490 495  
 Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly Thr Phe Val Ala Asp  
 500 505 510  
 Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp Leu Ser Glu Trp Met  
 515 520 525  
 Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala Gly  
 530 535 540

<210> 7  
 <211> 1692  
 <212> ADN  
 <213> Pseudomonas acidovorans

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1692)

<400> 7  
 atg tcc cac ccc gcc atc tcc ctg caa gcg ctg cgc ggc agc ggc gca 48  
 Met Ser His Pro Ala Ile Ser Leu Gln Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala  
 1 5 10 15  
 gac ata cag tcc atc cac atc ccc tac gag cgc cat gcc gac cag gac 96  
 Asp Ile Gln Ser Ile His Ile Pro Tyr Glu Arg His Ala Asp Gln Asp  
 20 25 30  
 gcc ggt gcg gac acg ccc gcc cgg cat ccc gtc gtc atc gtc ggc gcc 144  
 Ala Gly Ala Asp Thr Pro Ala Arg His Pro Val Val Ile Val Gly Ala  
 35 40 45  
 ggc ccc gtg ggc ctg tcg ctg gcc atc gac ctg gcc cag cgc ggc cag 192  
 Gly Pro Val Gly Leu Ser Leu Ala Ile Asp Leu Ala Gln Arg Gly Gln  
 50 55 60  
 cgc gtg gtg ctg ctg gac aac gac tgc cgg ctg tcc acg ggc tcg cgc 240  
 Arg Val Val Leu Leu Asp Asn Asp Cys Arg Leu Ser Thr Gly Ser Arg  
 65 70 75 80  
 gcc atc tgc ttt tcc aag cgc acg ctg gag atc tgg gac cgc ctg ggc 288  
 Ala Ile Cys Phe Ser Lys Arg Thr Leu Glu Ile Trp Asp Arg Leu Gly  
 85 90 95  
 gtg ggc cag ccc atg gtg gac aag ggc gtg tcc tgg aac ctg ggc aag 336  
 Val Gly Gln Pro Met Val Asp Lys Gly Val Ser Trp Asn Leu Gly Lys  
 100 105 110  
 gtc ttc ttc aag gac cag ccg ctg tac cgc ttc gac ctg ctg ccc gag 384

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Val | Phe | Phe | Lys | Asp | Gln | Pro | Leu | Tyr | Arg | Phe | Asp | Leu | Leu | Pro | Glu |      |
|     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |      |
| gac | ggc | cac | gag | cgc | ccg | gcc | ttc | atc | aac | ctg | cag | cag | tac | tac | gcc | 432  |
| Asp | Gly | His | Glu | Arg | Pro | Ala | Phe | Ile | Asn | Leu | Gln | Gln | Tyr | Tyr | Ala |      |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |      |
| gag | gcc | tat | ctg | gtc | gag | cgc | gca | ctg | cag | ctg | ccg | ctg | atc | gac | ctg | 480  |
| Glu | Ala | Tyr | Leu | Val |     | 150 | Ala | Leu | Gln | Pro | Leu | Ile | Asp | Leu |     |      |
|     | 145 |     |     |     |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |      |
| cgc | tgg | cac | agc | aag | gtc | acg | gca | ctg | gag | ccg | cag | gcc | gag | ggc | gcg | 528  |
| Arg | Trp | His | Ser | Lys | Val | Thr | Ala | Leu | Glu | Pro | Gln | Ala | Glu | Gly | Ala |      |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |      |
| ctg | ctg | acc | gtg | gag | acg | cct | gac | ggc | agc | tac | cgc | atc | gat | gcg | caa | 576  |
| Leu | Leu | Thr | Val | Glu | Thr | Pro | Asp | Gly | Ser | Tyr | Arg | Ile | Asp | Ala | Gln |      |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |      |
| tgg | gtc | ctg | gcc | tgc | gat | ggc | tcg | cgc | tcg | ccg | ctg | cgc | ggc | ctg | ctg | 624  |
| Trp | Val | Leu | Ala | Cys | Asp | Gly | Ser | Arg | Ser | Pro | Leu | Arg | Gly | Leu | Leu |      |
|     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |      |
| ggc | cag | gaa | agc | cat | ggc | cgc | atc | ttc | cgc | gac | cgc | ttc | ctg | atc | gcc | 672  |
| Gly | Gln | Glu | Ser | His | Gly | Arg | Ile | Phe | Arg | Asp |     | Phe | Leu | Ile | Ala |      |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |      |
| gac | gtg | aag | atg | cac | gcc | gaa | ttc | ccc | acc | gag | cgc | tgg | ttc | tgg | ttc | 720  |
| Asp | Val | Lys | Met | His | Ala | Glu | Phe | Pro | Thr | Glu | Arg | Trp | Phe | Trp | Phe |      |
|     | 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |      |
| gac | ccg | ccc | ttc | cac | ccg | ggc | cag | agc | gtg | ctg | ctg | cac | cgc | cag | ccc | 768  |
| Asp | Pro | Pro | Phe | His | Pro | Gly | Gln | Ser | Val | Leu | Leu | His | Arg | Gln | Pro |      |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |      |
| gac | gat | gtc | tgg | cgc | atc | gac | ttc | cag | ctg | ggc | tgg | gac | gcg | gac | ccc | 816  |
| Asp | Asp | Val | Trp | Arg | Ile | Asp | Phe | Gln | Leu | Gly | Trp | Asp | Ala | Asp | Pro |      |
|     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |      |
| gag | gaa | gag | aaa | aag | ccc | gag | aac | atc | gtg | ccg | cgc | atc | cgc | gcc | ctg | 864  |
| Glu | Glu | Glu | Lys | Lys | Pro | Glu | Asn | Ile | Val | Pro | Arg | Ile | Arg | Ala | Leu |      |
|     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |      |
| ctg | ggc | aag | gac | gcg | ccc | ttc | gag | ctg | gaa | tgg | gcc | agc | gtc | tac | acc | 912  |
| Leu | Gly | Lys | Asp | Ala | Pro | Phe | Glu | Leu | Glu | Trp |     | Ser | Val | Tyr | Thr |      |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |      |
| ttc | gcc | tgc | ctg | cgc | atg | gac | cgc | ttc | gtc | cat | ggc | cgc | gtg | gtc | ttt | 960  |
| Phe | Ala | Cys | Leu | Arg | Met | Asp | Arg | Phe | Val | His | Gly | Arg | Val | Val | Phe |      |
|     | 305 |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |      |
| gcg | ggc | gac | agc | gcc | cac | ggc | gtc | tcg | ccg | ttt | ggc | gca | cgc | ggc | gcc | 1008 |
| Ala | Gly | Asp | Ser | Ala | His | Gly | Val | Ser | Pro | Phe | Gly | Ala | Arg | Gly | Ala |      |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |
| aac | agc | ggc | gtg | cag | gat | gcc | gag | aac | ctg | gca | tgg | aag | ctg | gac | cgc | 1056 |
| Asn | Ser | Gly | Val | Gln | Asp | Ala | Glu | Asn | Leu | Ala | Trp | Lys | Leu | Asp | Arg |      |
|     |     |     | 340 |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |     |      |
| gtg | ctg | cgc | ggc | cag | gcc | gat | gcc | tcg | ctg | atc | gcc | acc | tac | ggc | gcc | 1104 |
| Val | Leu | Arg | Gly | Gln | Ala | Asp | Ala | Ser | Leu | Ile | Ala | Thr | Tyr | Gly | Ala |      |
|     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |
| gag | cgc | gaa | tac | gcg | gcc | gac | gag | aac | atc | cgc | aac | tcc | acg | cgc | gcc | 1152 |
| Glu | Arg | Glu | Tyr | Ala | Ala | Asp | Glu | Asn | Ile | Arg | Asn | Ser | Thr | Arg | Ala |      |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |      |
| acc | gac | ttc | atc | acg | ccc | aag | agc | gag | atc | agc | cgc | ctg | ttt | cgc | gac | 1200 |

Thr Asp Phe Ile Thr Pro Lys Ser Glu Ile Ser Arg Leu Phe Arg Asp  
 385 390 395 400  
 gcc gtg ctg gac ctg gcg cgc gac cat gaa ttc gcg cgc cgc atc gtc 1248  
 Ala Val Leu Asp Leu Ala Arg Asp His Glu Phe Ala Arg Arg Ile Val  
 405 410 415  
 aac agc ggg cgg ctg tcc gtg ccg gcc acg ctg cac ggc tcc gcg ctc 1296  
 Asn Ser Gly Arg Leu Ser Val Pro Ala Thr Leu His Gly Ser Ala Leu  
 420 425 430  
 aac acg cct gac acc gac acc ttc gac gga acg cag ctg ccc ggc gcc 1344  
 Asn Thr Pro Asp Thr Asp Thr Phe Asp Gly Thr Gln Leu Pro Gly Ala  
 435 440 445  
 gtg ctg gcc gat gcg ccc atg cgc cgg ccc ggc gca gac ggc acg gcc 1392  
 Val Leu Ala Asp Ala Pro Met Arg Arg Pro Gly Ala Asp Gly Thr Ala  
 450 455 460  
 tgg ctg ctg cgc gca ctg gga ccg gac ttc acg ctg ctg cac ttc gac 1440  
 Trp Leu Leu Arg Ala Leu Gly Pro Asp Phe Thr Leu Leu His Phe Asp  
 465 470 475 480  
 ccc acg ccc gcc tgg gcg cag gcg ctg ccc ggc gtg ctc aac ctg tcc 1488  
 Pro Thr Pro Ala Trp Ala Gln Ala Leu Pro Gly Val Leu Asn Leu Ser  
 485 490 495  
 atc gcg gcc gag ggc gag gcc cat gcg cca gac gcc gac ctc atc gat 1536  
 Ile Ala Ala Glu Gly Glu Ala His Ala Pro Asp Ala Asp Leu Ile Asp  
 500 505 510  
 gcg cgc ggc ctg gcg gcc aaa cgc ctg gat gca cgc ccc ggc acc agc 1584  
 Ala Arg Gly Leu Ala Ala Lys Arg Leu Asp Ala Arg Pro Gly Thr Ser  
 515 520 525  
 tac ctg ctg cgg cct gac cag cat gtc tgc gcg cgc tgg cgc cgc ccc 1632  
 Tyr Leu Leu Arg Pro Asp Gln His Val Cys Ala Arg Trp Arg Arg Pro  
 530 535 540  
 gac gaa gcc agc gtg cgc gcc gcg ctg caa aga gcc tgc ggc gcc gcc 1680  
 Asp Glu Ala Ser Val Arg Ala Ala Leu Gln Arg Ala Cys Gly Ala Ala  
 545 550 555 560  
 gcc acg gcc tga  
 Ala Thr Ala 1692

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 564

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Pseudomonas acidovorans

&lt;400&gt; 8

Met Ser His Pro Ala Ile Ser Leu Gln Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Asp Ile Gln Ser Ile His Ile Pro Tyr Glu Arg His Ala Asp Gln Asp  
 20 25 30  
 Ala Gly Ala Asp Thr Pro Ala Arg His Pro Val Val Ile Val Gly Ala  
 35 40 45  
 Gly Pro Val Gly Leu Ser Leu Ala Ile Asp Leu Ala Gln Arg Gly Gln  
 50 55 60  
 Arg Val Val Leu Leu Asp Asn Asp Cys Arg Leu Ser Thr Gly Ser Arg  
 65 70 75 80

Ala Ile Cys Phe Ser Lys Arg Thr Leu Glu Ile Trp Asp Arg Leu Gly  
 85 90 95  
 Val Gly Gln Pro Met Val Asp Lys Gly Val Ser Trp Asn Leu Gly Lys  
 100 105 110  
 Val Phe Phe Lys Asp Gln Pro Leu Tyr Arg Phe Asp Leu Leu Pro Glu  
 115 120 125  
 Asp Gly His Glu Arg Pro Ala Phe Ile Asn Leu Gln Gln Tyr Tyr Ala  
 130 135 140  
 Glu Ala Tyr Leu Val Glu Arg Ala Leu Gln Leu Pro Leu Ile Asp Leu  
 145 150 155 160  
 Arg Trp His Ser Lys Val Thr Ala Leu Glu Pro Gln Ala Glu Gly Ala  
 165 170 175  
 Leu Leu Thr Val Glu Thr Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Ile Asp Ala Gln  
 180 185 190  
 Trp Val Leu Ala Cys Asp Gly Ser Arg Ser Pro Leu Arg Gly Leu Leu  
 195 200 205  
 Gly Gln Glu Ser His Gly Arg Ile Phe Arg Asp Arg Phe Leu Ile Ala  
 210 215 220  
 Asp Val Lys Met His Ala Glu Phe Pro Thr Glu Arg Trp Phe Trp Phe  
 225 230 235 240  
 Asp Pro Pro Phe His Pro Gly Gln Ser Val Leu Leu His Arg Gln Pro  
 245 250 255  
 Asp Asp Val Trp Arg Ile Asp Phe Gln Leu Gly Trp Asp Ala Asp Pro  
 260 265 270  
 Glu Glu Glu Lys Lys Pro Glu Asn Ile Val Pro Arg Ile Arg Ala Leu  
 275 280 285  
 Leu Gly Lys Asp Ala Pro Phe Glu Leu Glu Trp Ala Ser Val Tyr Thr  
 290 295 300  
 Phe Ala Cys Leu Arg Met Asp Arg Phe Val His Gly Arg Val Val Phe  
 305 310 315 320  
 Ala Gly Asp Ser Ala His Gly Val Ser Pro Phe Gly Ala Arg Gly Ala  
 325 330 335  
 Asn Ser Gly Val Gln Asp Ala Glu Asn Leu Ala Trp Lys Leu Asp Arg  
 340 345 350  
 Val Leu Arg Gly Gln Ala Asp Ala Ser Leu Ile Ala Thr Tyr Gly Ala  
 355 360 365  
 Glu Arg Glu Tyr Ala Ala Asp Glu Asn Ile Arg Asn Ser Thr Arg Ala  
 370 375 380  
 Thr Asp Phe Ile Thr Pro Lys Ser Glu Ile Ser Arg Leu Phe Arg Asp  
 385 390 395 400  
 Ala Val Leu Asp Leu Ala Arg Asp His Glu Phe Ala Arg Arg Ile Val  
 405 410 415  
 Asn Ser Gly Arg Leu Ser Val Pro Ala Thr Leu His Gly Ser Ala Leu  
 420 425 430  
 Asn Thr Pro Asp Thr Asp Thr Phe Asp Gly Thr Gln Leu Pro Gly Ala  
 435 440 445

Val Leu Ala Asp Ala Pro Met Arg Arg Pro Gly Ala Asp Gly Thr Ala  
 450 455 460  
 Trp Leu Leu Arg Ala Leu Gly Pro Asp Phe Thr Leu Leu His Phe Asp  
 465 470 475 480  
 Pro Thr Pro Ala Trp Ala Gln Ala Leu Pro Gly Val Leu Asn Leu Ser  
 485 490 495  
 Ile Ala Ala Glu Gly Glu Ala His Ala Pro Asp Ala Asp Leu Ile Asp  
 500 505 510  
 Ala Arg Gly Leu Ala Ala Lys Arg Leu Asp Ala Arg Pro Gly Thr Ser  
 515 520 525  
 Tyr Leu Leu Arg Pro Asp Gln His Val Cys Ala Arg Trp Arg Arg Pro  
 530 535 540  
 Asp Glu Ala Ser Val Arg Ala Ala Leu Gln Arg Ala Cys Gly Ala Ala  
 545 550 555 560  
 Ala Thr Ala

<210> 9  
 <211> 966  
 <212> ADN  
 <213> Pseudomonas acidovorans

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(966)

<400> 9  
 atg acc acc aag acc ttt gcc tcc gcc gcc gac ctc gaa atc aag cag 48  
 Met Thr Thr Lys Thr Phe Ala Ser Ala Ala Asp Leu Glu Ile Lys Gln  
 1 5 10 15  
 gtc agc ttc gac aag ctc tcc gag cac gcc tat gcc tac acg gcc gaa 96  
 Val Ser Phe Asp Lys Leu Ser Glu His Ala Tyr Ala Tyr Thr Ala Glu  
 20 25 30  
 ggc gac ccc aac acc ggc atc atc att ggc gac gac gcg gtg atg gtg 144  
 Gly Asp Pro Asn Thr Gly Ile Ile Ile Gly Asp Asp Ala Val Met Val  
 35 40 45  
 atc gac acc cag gcc acg ccc gtc atg gcc cag gac gtg atc cgc cgc 192  
 Ile Asp Thr Gln Ala Thr Pro Val Met Ala Gln Asp Val Ile Arg Arg  
 50 55 60  
 atc cgt gag gtc acg gac aag ccc atc aag tac gtg acg ctg tcg cac 240  
 Ile Arg Glu Val Thr Asp Lys Pro Ile Lys Tyr Val Thr Leu Ser His  
 65 70 75 80  
 tac cac gcg gtg cgc gtg ctg ggc gcc tcg gcc ttc ttc gcg gaa ggc 288  
 Tyr His Ala Val Arg Val Leu Gly Ala Ser Ala Phe Phe Ala Glu Gly  
 85 90 95  
 gcc gaa cac atc att gcc agc cag gac acc tac gac ctc atc gtg gag 336  
 Ala Glu His Ile Ile Ala Ser Gln Asp Thr Tyr Asp Leu Ile Val Glu  
 100 105 110  
 cgc ggc gag cag gac aag gcc agc gag atc ggc cgc ttt ccc cgc ctg 384  
 Arg Gly Glu Gln Asp Lys Ala Ser Glu Ile Gly Arg Phe Pro Arg Leu  
 115 120 125  
 ttc cag aac gtg gaa agc gtg ccc gat ggc atg acc tgg ccc acc ctc 432



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Phe | Gln | Asn | Val | Glu | Ser | Val | Pro | Asp | Gly | Met | Thr | Trp | Pro | Thr | Leu |     |  |
| 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |  |
| acc | ttc | acc | ggc | aag | atg | acg | ctg | tgg | ctg | ggc | aag | ctg | gaa | gtg | cag | 480 |  |
| Thr | Phe | Thr | Gly | Lys | Met | Thr | Leu | Trp | Leu | Gly | Lys | Leu | Glu | Val | Gln | 160 |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     |     |  |
| atc | ctg | cag | ctg | ggc | cgc | ggc | cac | acc | aag | ggc | gac | acc | gtg | gtc | tgg | 528 |  |
| Ile | Leu | Gln | Leu | Gly | Arg | Gly | His | Thr | Lys | Gly | Asp | Thr | Val | Val | Trp | 175 |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     |     |     |  |
| ctg | ccc | cag | gac | aag | gtg | ctg | ttc | agc | ggc | gac | ctg | gtg | gag | ttc | ggc | 576 |  |
| Leu | Pro | Gln | Asp | Lys | Val | Leu | Phe | Ser | Gly | Asp | Leu | Val | Glu | Phe | Gly | 190 |  |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| ggc | acg | ccc | tat | gcg | ggc | gat | gcc | tac | ttc | cag | gac | tgg | ccg | cac | acg | 624 |  |
| Ala | Thr | Pro | Tyr | Ala | Gly | Asp | Ala | Tyr | Phe | Gln | Asp | Trp | Pro | His | Thr | 205 |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| ctg | gac | gcc | atc | gcc | gcc | ctg | cag | ccc | gaa | aag | ctc | gtg | ccc | ggc | cgg | 672 |  |
| Leu | Asp | Ala | Ile | Ala | Ala | Leu | Gln | Pro | Glu | Lys | Leu | Val | Pro | Gly | Arg | 220 |  |
|     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| ggc | gcc | gcg | ctg | cag | acg | ccg | gcc | gag | gtg | cag | gcc | ggc | ctg | gcc | ggc | 720 |  |
| Gly | Ala | Ala | Leu | Gln | Thr | Pro | Ala | Glu | Val | Gln | Ala | Gly | Leu | Ala | Gly | 240 |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     |     |     |  |
| acg | cgc | gac | ttc | atc | agc | gac | ctg | tgg | acc | gag | gtc | aag | gcc | ggc | gcc | 768 |  |
| Thr | Arg | Asp | Phe | Ile | Ser | Asp | Leu | Trp | Thr | Glu | Val | Lys | Ala | Gly | Ala | 255 |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     |     |     |  |
| gat | gcc | cag | cag | gac | ctg | cgc | aag | gtc | tac | gag | gcc | gcc | ttc | gcc | aag | 816 |  |
| Asp | Ala | Gln | Gln | Asp | Leu | Arg | Lys | Val | Tyr | Glu | Ala | Ala | Phe | Ala | Lys | 270 |  |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| ctg | cag | ccc | aag | tac | ggc | cag | tgg | gtg | atc | ttc | aac | cac | tgc | atg | ccc | 864 |  |
| Leu | Gln | Pro | Lys | Tyr | Gly | Gln | Trp | Val | Ile | Phe | Asn | His | Cys | Met | Pro | 285 |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| ttc | gat | gtg | acc | cgc | gcc | tat | gac | gag | gca | tcg | ggc | cac | gcc | gac | cca | 912 |  |
| Phe | Asp | Val | Thr | Arg | Ala | Tyr | Asp | Glu | Ala | Ser | Gly | His | Ala | Asp | Pro | 300 |  |
|     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| cgc | atc | tgg | acc | gcc | gag | cgc | gac | cgc | cag | atg | tgg | ctg | gcg | ctc | gaa | 960 |  |
| Arg | Ile | Trp | Thr | Ala | Glu | Arg | Asp | Arg | Gln | Met | Trp | Leu | Ala | Leu | Glu | 320 |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     |     |     |  |
| ggc | tga |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 966 |  |
| Gly |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 322

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Pseudomonas acidovorans

&lt;400&gt; 10

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Thr | Lys | Thr | Phe | Ala | Ser | Ala | Ala | Asp | Leu | Glu | Ile | Lys | Gln |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Ser | Phe | Asp | Lys | Leu | Ser | Glu | His | Ala | Tyr | Ala | Tyr | Thr | Ala | Glu |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Asp | Pro | Asn | Thr | Gly | Ile | Ile | Ile | Gly | Asp | Asp | Ala | Val | Met | Val |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Asp | Thr | Gln | Ala | Thr | Pro | Val | Met | Ala | Gln | Asp | Val | Ile | Arg | Arg |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

Ile Arg Glu Val Thr Asp Lys Pro Ile Lys Tyr Val Thr Leu Ser His  
 65 70 75 80  
 Tyr His Ala Val Arg Val Leu Gly Ala Ser Ala Phe Phe Ala Glu Gly  
 85 90 95  
 Ala Glu His Ile Ile Ala Ser Gln Asp Thr Tyr Asp Leu Ile Val Glu  
 100 105 110  
 Arg Gly Glu Gln Asp Lys Ala Ser Glu Ile Gly Arg Phe Pro Arg Leu  
 115 120 125  
 Phe Gln Asn Val Glu Ser Val Pro Asp Gly Met Thr Trp Pro Thr Leu  
 130 135 140  
 Thr Phe Thr Gly Lys Met Thr Leu Trp Leu Gly Lys Leu Glu Val Gln  
 145 150 155 160  
 Ile Leu Gln Leu Gly Arg Gly His Thr Lys Gly Asp Thr Val Val Trp  
 165 170 175  
 Leu Pro Gln Asp Lys Val Leu Phe Ser Gly Asp Leu Val Glu Phe Gly  
 180 185 190  
 Ala Thr Pro Tyr Ala Gly Asp Ala Tyr Phe Gln Asp Trp Pro His Thr  
 195 200 205  
 Leu Asp Ala Ile Ala Ala Leu Gln Pro Glu Lys Leu Val Pro Gly Arg  
 210 215 220  
 Gly Ala Ala Leu Gln Thr Pro Ala Glu Val Gln Ala Gly Leu Ala Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Arg Asp Phe Ile Ser Asp Leu Trp Thr Glu Val Lys Ala Gly Ala  
 245 250 255  
 Asp Ala Gln Gln Asp Leu Arg Lys Val Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Lys  
 260 265 270  
 Leu Gln Pro Lys Tyr Gly Gln Trp Val Ile Phe Asn His Cys Met Pro  
 275 280 285  
 Phe Asp Val Thr Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ser Gly His Ala Asp Pro  
 290 295 300  
 Arg Ile Trp Thr Ala Glu Arg Asp Arg Gln Met Trp Leu Ala Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Gly

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 966

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: mutant d'HPAC de P. acidovorans

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(966)

&lt;400&gt; 11

atg tcc acc aag acc ttt gcc tcc gcc gcc gac ctc gaa atc aag cag 48  
 Met Ser Thr Lys Thr Phe Ala Ser Ala Ala Asp Leu Glu Ile Lys Gln

| 1                 | 5                |                   |                   |                   |                   | 10                |                   |                   |                   |                   | 15                |                   |                   |                   |                   |     |
|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|
| gtc<br>Val        | agc<br>Ser       | ttc<br>Phe        | gac<br>Asp<br>20  | aag<br>Lys        | ctc<br>Leu        | tcc<br>Ser        | gag<br>Glu        | cac<br>His<br>25  | gcc<br>Ala        | tat<br>Tyr        | gcc<br>Ala        | tac<br>Tyr        | acg<br>Thr<br>30  | gcc<br>Ala        | gaa<br>Glu        | 96  |
| ggc<br>Gly        | gac<br>Asp       | ccc<br>Pro<br>35  | aac<br>Asn        | acc<br>Thr        | ggc<br>Gly        | atc<br>Ile<br>40  | atc<br>Ile        | att<br>Ile        | ggc<br>Gly        | gac<br>Asp        | gac<br>Asp        | gcg<br>Ala<br>45  | gtg<br>Val        | atg<br>Met        | gtg<br>Val        | 144 |
| atc<br>Ile        | gac<br>Asp<br>50 | acc<br>Thr        | cag<br>Gln        | gcc<br>Ala        | acg<br>Thr        | ccc<br>Pro<br>55  | gtc<br>Val        | atg<br>Met        | gcc<br>Ala        | cag<br>Gln        | gac<br>Asp<br>60  | gtg<br>Val        | atc<br>Ile        | cgc<br>Arg        | cgc<br>Arg        | 192 |
| atc<br>Ile<br>65  | cgt<br>Arg       | gag<br>Glu        | gtc<br>Val        | acg<br>Thr<br>70  | gac<br>Asp        | aag<br>Lys        | ccc<br>Pro        | atc<br>Ile        | aag<br>Lys        | tac<br>Tyr<br>75  | gtg<br>Val        | acg<br>Thr        | ctg<br>Leu        | tgc<br>Ser        | cac<br>His<br>80  | 240 |
| tac<br>Tyr        | cac<br>His       | gcg<br>Ala        | gtg<br>Val        | cgc<br>Arg<br>85  | gtg<br>Val        | ctg<br>Leu        | ggc<br>Gly        | gcc<br>Ala        | tgc<br>Ser<br>90  | gcc<br>Ala        | ttc<br>Phe        | ttc<br>Phe        | gcg<br>Ala        | gaa<br>Glu<br>95  | ggc<br>Gly        | 288 |
| gcc<br>Ala        | gaa<br>Glu       | cac<br>His        | atc<br>Ile<br>100 | att<br>Ile        | gcc<br>Ala        | agc<br>Ser        | cag<br>Gln        | gac<br>Asp<br>105 | acc<br>Thr        | tac<br>Tyr        | gac<br>Asp        | ctc<br>Leu        | atc<br>Ile<br>110 | gtg<br>Val        | gag<br>Glu        | 336 |
| cgc<br>Arg        | ggc<br>Gly       | gag<br>Glu<br>115 | cag<br>Gln        | gac<br>Asp        | aag<br>Lys        | gcc<br>Ala        | agc<br>Ser<br>120 | gag<br>Glu        | atc<br>Ile        | ggc<br>Gly        | cgc<br>Arg        | ttt<br>Phe<br>125 | ccc<br>Pro        | cgc<br>Arg        | ctg<br>Leu        | 384 |
| ttc<br>Phe<br>130 | cag<br>Gln       | aac<br>Asn        | gtg<br>Val        | gaa<br>Glu        | agc<br>Ser        | gtg<br>Val<br>135 | ccc<br>Pro        | gat<br>Asp        | ggc<br>Gly        | atg<br>Met        | acc<br>Thr<br>140 | tgg<br>Trp        | ccc<br>Pro        | acc<br>Thr        | ctc<br>Leu        | 432 |
| acc<br>Thr<br>145 | ttc<br>Phe       | acc<br>Thr        | ggc<br>Gly        | aag<br>Lys        | atg<br>Met<br>150 | acg<br>Thr        | ctg<br>Leu        | tgg<br>Trp        | ctg<br>Leu        | ggc<br>Gly<br>155 | aag<br>Lys        | ctg<br>Leu        | gaa<br>Glu        | gtg<br>Val        | cag<br>Gln<br>160 | 480 |
| atc<br>Ile        | ctg<br>Leu       | cag<br>Gln        | ctg<br>Leu        | ggc<br>Gly<br>165 | cgc<br>Arg        | ggc<br>Gly        | cac<br>His        | acc<br>Thr        | aag<br>Lys<br>170 | ggc<br>Gly        | gac<br>Asp        | acc<br>Thr        | gtg<br>Val        | gtc<br>Val        | tgg<br>Trp<br>175 | 528 |
| ctg<br>Leu        | ccc<br>Pro       | cag<br>Gln        | gac<br>Asp<br>180 | aag<br>Lys        | gtg<br>Val        | ctg<br>Leu        | ttc<br>Phe        | agc<br>Ser<br>185 | ggc<br>Gly        | gac<br>Asp        | ctg<br>Leu        | gtg<br>Val        | gag<br>Glu<br>190 | ttc<br>Phe        | ggc<br>Gly        | 576 |
| gcc<br>Ala        | acg<br>Thr       | ccc<br>Pro<br>195 | tat<br>Tyr        | gcg<br>Ala        | ggc<br>Gly        | gat<br>Asp        | gcc<br>Ala<br>200 | tac<br>Tyr        | ttc<br>Phe        | cag<br>Gln        | gac<br>Asp        | tgg<br>Trp<br>205 | ccg<br>Pro        | cac<br>His        | acg<br>Thr        | 624 |
| ctg<br>Leu<br>210 | gac<br>Asp       | acc<br>Thr        | atc<br>Ile        | gcc<br>Ala        | gcc<br>Ala        | ctg<br>Leu<br>215 | cag<br>Gln        | ccc<br>Pro        | gaa<br>Glu        | aag<br>Lys        | ctc<br>Leu<br>220 | gtg<br>Val        | ccc<br>Pro        | ggc<br>Gly        | cgg<br>Arg        | 672 |
| ggc<br>Gly<br>225 | gcc<br>Ala       | gcg<br>Ala        | ctg<br>Leu        | cag<br>Gln        | acg<br>Thr<br>230 | ccg<br>Pro        | gcc<br>Ala        | gag<br>Glu        | gtg<br>Val        | cag<br>Gln<br>235 | gcc<br>Ala        | ggc<br>Gly        | ctg<br>Leu        | gcc<br>Ala        | ggc<br>Gly<br>240 | 720 |
| acg<br>Thr        | cgc<br>Arg       | gac<br>Asp        | ttc<br>Phe        | atc<br>Ile<br>245 | agc<br>Ser        | gac<br>Asp        | ctg<br>Leu        | tgg<br>Trp<br>250 | acc<br>Thr        | gag<br>Glu        | gtc<br>Val        | aag<br>Lys        | gcc<br>Ala        | ggc<br>Gly<br>255 | gcc<br>Ala        | 768 |
| gat<br>Asp        | gcc<br>Ala       | cag<br>Gln        | cag<br>Gln<br>260 | gac<br>Asp        | ctg<br>Leu        | cgc<br>Arg        | aag<br>Lys        | gtc<br>Val<br>265 | tac<br>Tyr        | gag<br>Glu        | gcc<br>Ala        | gcc<br>Ala        | ttc<br>Phe<br>270 | gcc<br>Ala        | aag<br>Lys        | 816 |
| ctg<br>Leu        | cag<br>Gln       | ccc<br>Pro        | aag<br>Lys        | tac<br>Tyr        | ggc<br>Gly        | cag<br>Gln        | tgg<br>Trp        | gtg<br>Val        | atc<br>Ile        | ttc<br>Phe        | aac<br>Asn        | cac<br>His        | tgc<br>Cys        | atg<br>Met        | ccc<br>Pro        | 864 |

275                      280                      285  
 ttc gat gtg acc cgc gcc tat gac gag gca tcg ggc cac gcc gac cca 912  
 Phe Asp Val Thr Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ser Gly His Ala Asp Pro  
 290                      295                      300  
 cgc atc tgg acc gcc gag cgc gac cgc cag atg tgg ctg gcg ctc gaa 960  
 Arg Ile Trp Thr Ala Glu Arg Asp Arg Gln Met Trp Leu Ala Leu Glu  
 305                      310                      315                      320  
 ggc tga  
 Gly 966  
  
 <210> 12  
 <211> 322  
 <212>  
 <213> Séquence artificielle  
 <223> Description de la séquence artificielle: mutant  
 d'HPAC de P. acidovorans  
  
 <400> 12  
 Met Ser Thr Lys Thr Phe Ala Ser Ala Ala Asp Leu Glu Ile Lys Gln  
 1                      5                      10                      15  
 Val Ser Phe Asp Lys Leu Ser Glu His Ala Tyr Ala Tyr Thr Ala Glu  
 20                      25                      30  
 Gly Asp Pro Asn Thr Gly Ile Ile Ile Gly Asp Asp Ala Val Met Val  
 35                      40                      45  
 Ile Asp Thr Gln Ala Thr Pro Val Met Ala Gln Asp Val Ile Arg Arg  
 50                      55                      60  
 Ile Arg Glu Val Thr Asp Lys Pro Ile Lys Tyr Val Thr Leu Ser His  
 65                      70                      75                      80  
 Tyr His Ala Val Arg Val Leu Gly Ala Ser Ala Phe Phe Ala Glu Gly  
 85                      90                      95  
 Ala Glu His Ile Ile Ala Ser Gln Asp Thr Tyr Asp Leu Ile Val Glu  
 100                      105                      110  
 Arg Gly Glu Gln Asp Lys Ala Ser Glu Ile Gly Arg Phe Pro Arg Leu  
 115                      120                      125  
 Phe Gln Asn Val Glu Ser Val Pro Asp Gly Met Thr Trp Pro Thr Leu  
 130                      135                      140  
 Thr Phe Thr Gly Lys Met Thr Leu Trp Leu Gly Lys Leu Glu Val Gln  
 145                      150                      155                      160  
 Ile Leu Gln Leu Gly Arg Gly His Thr Lys Gly Asp Thr Val Val Trp  
 165                      170                      175  
 Leu Pro Gln Asp Lys Val Leu Phe Ser Gly Asp Leu Val Glu Phe Gly  
 180                      185                      190  
 Ala Thr Pro Tyr Ala Gly Asp Ala Tyr Phe Gln Asp Trp Pro His Thr  
 195                      200                      205  
 Leu Asp Thr Ile Ala Ala Leu Gln Pro Glu Lys Leu Val Pro Gly Arg  
 210                      215                      220  
 Gly Ala Ala Leu Gln Thr Pro Ala Glu Val Gln Ala Gly Leu Ala Gly  
 225                      230                      235                      240  
 Thr Arg Asp Phe Ile Ser Asp Leu Trp Thr Glu Val Lys Ala Gly Ala

245 250 255  
 Asp Ala Gln Gln Asp Leu Arg Lys Val Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Lys  
 260 265 270  
 Leu Gln Pro Lys Tyr Gly Gln Trp Val Ile Phe Asn His Cys Met Pro  
 275 280 285  
 Phe Asp Val Thr Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ser Gly His Ala Asp Pro  
 290 295 300  
 Arg Ile Trp Thr Ala Glu Arg Asp Arg Gln Met Trp Leu Ala Leu Glu  
 305 310 315 320

Gly.

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 966

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: mutant d'HPAC de P. acidovorans

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(966)

&lt;400&gt; 13

atg tcc acc aag acc ttt gcc tcc gcc gcc gac ctc gaa atc aag cag 48  
 Met Ser Thr Lys Thr Phe Ala Ser Ala Ala Asp Leu Glu Ile Lys Gln  
 1 5 10 15  
 gtc agc ttc gac aag ctc tcc gag cac gcc tat gcc tac acg gcc gaa 96  
 Val Ser Phe Asp Lys Leu Ser Glu His Ala Tyr Ala Tyr Thr Ala Glu  
 20 25 30  
 ggc gac ccc aac acc ggc atc atc att ggc gac gac gcg gtg atg gtg 144  
 Gly Asp Pro Asn Thr Gly Ile Ile Ile Gly Asp Asp Ala Val Met Val  
 35 40 45  
 atc gac acc cag gcc acg ccc gtc atg gcc cag gac gtg atc cgc cgc 192  
 Ile Asp Thr Gln Ala Thr Pro Val Met Ala Gln Asp Val Ile Arg Arg  
 50 55 60  
 atc cgt gag gtc acg gac aag ccc atc aag tac gtg acg ctg tcg cac 240  
 Ile Arg Glu Val Thr Asp Lys Pro Ile Lys Tyr Val Thr Leu Ser His  
 65 70 75 80  
 tac cac gcg gtg cgc gtg ctg ggc gcc tcg gcc ttc ttc gcg gaa ggc 288  
 Tyr His Ala Val Arg Val Leu Gly Ala Ser Ala Phe Phe Ala Glu Gly  
 85 90 95  
 gcc gaa cac atc att gcc agc cag gac acc tac gac ctc atc gtg gag 336  
 Ala Glu His Ile Ile Ala Ser Gln Asp Thr Tyr Asp Leu Ile Val Glu  
 100 105 110  
 cgc ggc gag cag gac aag gcc agc gag atc ggc cgc ttt ccc cgc ctg 384  
 Arg Gly Glu Gln Asp Lys Ala Ser Glu Ile Gly Arg Phe Pro Arg Leu  
 115 120 125  
 ttc cag aac gtg gaa agc gtg ccc gat ggc atg acc tgg ccc acc ctc 432  
 Phe Gln Asn Val Glu Ser Val Pro Asp Gly Met Thr Trp Pro Thr Leu  
 130 135 140  
 acc ttc acc ggc aag atg acg ctg tgg ctg ggc aag ctg gaa gtg cag 480

Thr Phe Thr Gly Lys Met Thr Leu Trp Leu Gly Lys Leu Glu Val Gln  
 145 150 155 160  
 atc ctg cag ctg ggc cgc ggc cac acc aag ggc gac acc gtg gtc tgg 528  
 Ile Leu Gln Leu Gly Arg Gly His Thr Lys Gly Asp Thr Val Val Trp  
 165 170 175  
 ctg ccc cag gac aag gtg ctg ttc agc ggc gac ctg gtg gag ttc ggc 576  
 Leu Pro Gln Asp Lys Val Leu Phe Ser Gly Asp Leu Val Glu Phe Gly  
 180 185 190  
 gcc acg ccc tat gcg ggc gat gcc tac ttc cag gac tgg ccg cac acg 624  
 Ala Thr Pro Tyr Ala Gly Asp Ala Tyr Phe Gln Asp Trp Pro His Thr  
 195 200 205  
 ctg gac gcc atc gcc gcc ctg cag ccc gaa aag ctc gtg ccc ggc cgg 672  
 Leu Asp Ala Ile Ala Ala Leu Gln Pro Glu Lys Leu Val Pro Gly Arg  
 210 215 220  
 ggc gcc gcg ctg cag acg ccg gcc gag gtg cag gcc ggc ctg gcc ggc 720  
 Gly Ala Ala Leu Gln Thr Pro Ala Glu Val Gln Ala Gly Leu Ala Gly  
 225 230 235 240  
 acg cgc gac ttc atc agc gac ctg tgg acc gag gtc aag gcc ggc gcc 768  
 Thr Arg Asp Phe Ile Ser Asp Leu Trp Thr Glu Val Lys Ala Gly Ala  
 245 250 255  
 gat gcc cag cag gac ctg cgc aag gtc tac gag gcc gcc ttc gcc aag 816  
 Asp Ala Gln Gln Asp Leu Arg Lys Val Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Lys  
 260 265 270  
 ctg cag ccc aag tac gcc cag tgg gtg atc ttc aac cac tgc atg ccc 864  
 Leu Gln Pro Lys Tyr Gly Gln Trp Val Ile Phe Asn His Cys Met Pro  
 275 280 285  
 ttc gat gtg acc cgc gcc tat gac gag gca tgc ggc cac gcc gac cca 912  
 Phe Asp Val Thr Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ser Gly His Ala Asp Pro  
 290 295 300  
 cgc atc tgg acc gcc gag cgc gac cgc cag atg tgg ctg gcg ctc gaa 960  
 Arg Ile Trp Thr Ala Glu Arg Asp Arg Gln Met Trp Leu Ala Leu Glu  
 305 310 315 320  
 ggc tga  
 Gly 966

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 322

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: mutant d'HPAC de P. acidovorans

&lt;400&gt; 14

Met Ser Thr Lys Thr Phe Ala Ser Ala Ala Asp Leu Glu Ile Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Val Ser Phe Asp Lys Leu Ser Glu His Ala Tyr Ala Tyr Thr Ala Glu  
 20 25 30  
 Gly Asp Pro Asn Thr Gly Ile Ile Ile Gly Asp Asp Ala Val Met Val  
 35 40 45  
 Ile Asp Thr Gln Ala Thr Pro Val Met Ala Gln Asp Val Ile Arg Arg  
 50 55 60  
 Ile Arg Glu Val Thr Asp Lys Pro Ile Lys Tyr Val Thr Leu Ser His

[illegible]

<221> terminator  
 <222> (2811)..(3549)

<400> 15

```

tgc atg ccta ggt c gagg ag aa at at g agt cg ag g cat gg at ac ac ta ag t t c c c c t g aa 60
gt g ag cat ga t c t t t g at gc tg ag at g att c c c ag ag caa ga ta g t t t gt g ct g ca ag t g 120
ac ac a att gt aa t gaa ac ca c c act ca ac g aa t t t t act t g t g g c t t t g ac at g t c g t g t g 180
ct ct g t t t gt at t t g t g ag t gcc g g t t g g t aa t t a t t t t t g t t a at g t ga t t t t a a a a c c 240
t c t t at g t aa at ag t t act t t at c t at t g a ag t g t g t t c t t g t g g t c t at ag t t t c t caa 300
ag g g a a at ta aa at g t t g ac at c c c at t t a ca at t g a t a c c t t g g t a t a c a c a a c t t t g 360
t aa a t t t g g t ga ta t t t at g t c g aa a g aa g g ca at a c c c at t g t at g t t c ca at a t caa 420
t at ca at a c g a t a a c t t g at a a t a c t a a c a t at g at t g t c at t g t t t t t c ag t at ca at 480
at ac at t a ag c t a c t a c a a a at t ag t a t a a at c a c t a t at t a t a a a t c t t t t t c g g t t g t 540
a a c t t g t a at t c g t g g g t t t t t a a a t a a a ag ca t g t g aa a a t t t t c a a a t a at g t g at g 600
g c g ca a t t t t at t t t c c g ag t t c c a a a a t a t t g c c g c t t c at t a c c c t a a t t t g t g g c g c 660
c a c at g t a a a a c a a a g a c g at t c t t ag t g g c t at c a c t g c c at c a c g c g ga t c a c t a at 720
at g a a c g t c ga t t a a a a c a ga t c g a c g g t t t a t a c at c a t t t t at t g t a c a c a g g at c 780
ga ta t c t c ag c g t t ag at t t a at at g c ga t c t g at t g c t c a a a a a t ag a c t c t c c g t c 840
t t t g c c t a t a a a a c a a t t t c a c at c t t t c t c a c c c a a a t c t a c t c t t a a c g t t c t t c t 900
t c t t c t a c ag a c at ca a t t t c t c t c g a c t c ta g a g g at c c a a g c t t at c g at t t c g a a c c 960
c c t c at g act t c a c t t a c a g t g t c c g g c g g t g g c g c g c a g g t c c t c a g c 1009
  Met Thr Ser Leu Thr Val Ser Gly Arg Val Ala Gln Val Leu Ser
    1             5             10             15
agc tat gtc agc gat gtg ttc ggt gtg atg ggc aac gga aac gtc tac 1057
Ser Tyr Val Ser Asp Val Phe Gly Val Met Gly Asn Gly Asn Val Tyr
          20             25             30
ttc ctg gac gcc gcc gag aag gag ggc ctc cgc ttc acg gcc gta cgc 1105
Phe Leu Asp Ala Ala Glu Lys Glu Gly Leu Arg Phe Thr Ala Val Arg
          35             40             45
cat gaa ggt gcc gcc atc gcg gcg gcg gac gcc tac tat cgg gca tcc 1153
His Glu Gly Ala Ala Ile Ala Ala Asp Ala Tyr Tyr Arg Ala Ser
          50             55             60
ggg cgc ctg gcg gcg ggg acc acc acc tac ggc ccc ggt tac acc aac 1201
Gly Arg Leu Ala Ala Gly Thr Thr Thr Tyr Gly Pro Gly Tyr Thr Asn
          65             70             75
gcc ctg acg gcc ctc gcc gag gcg gtc cag gcg cag atc ccc gtg gtg 1249
Ala Leu Thr Ala Leu Ala Glu Ala Val Gln Ala Gln Ile Pro Val Val
          80             85             90             95
ctc gtc acc ggg gac gcc ccg agc agc ggc gcc cgg cct tgg gac gtg 1297
Leu Val Thr Gly Asp Ala Pro Ser Ser Gly Ala Arg Pro Trp Asp Val
          100             105             110
gac cag gcc gcg atc gcc gcc ggg ctg ggg gcg gcg acc ttc acg gtc 1345
Asp Gln Ala Ala Ile Ala Ala Gly Leu Gly Ala Ala Thr Phe Thr Val
          115             120             125

```



|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| acc cgt gaa gcc gca ggc tcc atc acg cag gaa gcg gtg gag tac gca | 1393 |
| Thr Arg Glu Ala Ala Gly Ser Ile Thr Gln Glu Ala Val Glu Tyr Ala |      |
| 130 135 140                                                     |      |
| ctt gcc cgg cgg acc gcc gtc gtg atc gcc gtt cca tac gac ctg tcg | 1441 |
| Leu Ala Arg Arg Thr Ala Val Val Ile Ala Val Pro Tyr Asp Leu Ser |      |
| 145 150 155                                                     |      |
| gcc ctt gag gcg gcg gag gaa gat ctt ccc gtg ccg ccg gcg gcc tcg | 1489 |
| Ala Leu Glu Ala Ala Glu Glu Asp Leu Pro Val Pro Pro Ala Ala Ser |      |
| 160 165 170 175                                                 |      |
| gtt ccg gac gcc atc ggc ggc gga ctc gga cgg gcg gcc gaa gtg cgg | 1537 |
| Val Pro Asp Ala Ile Gly Gly Gly Leu Arg Ala Ala Glu Val Arg     |      |
| 180 185 190                                                     |      |
| gcg gcc gaa ttg ctg gcg ggc gcg aag cgg ccg ctc atc ctt gcc ggc | 1585 |
| Ala Ala Glu Leu Leu Ala Gly Ala Lys Arg Pro Leu Ile Leu Ala Gly |      |
| 195 200 205                                                     |      |
| cgc ggt gcg cac ctc gca gga acc ggc ccc gaa ctc cgg gaa ctc gcc | 1633 |
| Arg Gly Ala His Leu Ala Gly Thr Gly Pro Glu Leu Arg Glu Leu Ala |      |
| 210 215 220                                                     |      |
| gac cgc ctc ggc gcg ctc acg gcc ggc acc gca ctg gcg ctg aac ctg | 1681 |
| Asp Arg Leu Gly Ala Leu Thr Ala Gly Thr Ala Leu Ala Leu Asn Leu |      |
| 225 230 235                                                     |      |
| ctg cag ggc gag ggg tac ctc ggc gtc gcg ggc ggc ttc ggc acg gat | 1729 |
| Leu Gln Gly Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ala Gly Gly Phe Gly Thr Asp |      |
| 240 245 250 255                                                 |      |
| acc gcc gcc ggg ctc atg ggc gag gcg gac gtg gtg ctc gtg gcg gga | 1777 |
| Thr Ala Ala Gly Leu Met Gly Glu Ala Asp Val Val Leu Val Ala Gly |      |
| 260 265 270                                                     |      |
| gcc agc ctg acc ccc ttc acc atg cgc ttc ggc cac ctg atc ggc ccg | 1825 |
| Ala Ser Leu Thr Pro Phe Thr Met Arg Phe Gly His Leu Ile Gly Pro |      |
| 275 280 285                                                     |      |
| gac gcc acc gtg atc cag atc gac acc gcc atg gag ccg acg gac ccg | 1873 |
| Asp Ala Thr Val Ile Gln Ile Asp Thr Ala Met Glu Pro Thr Asp Pro |      |
| 290 295 300                                                     |      |
| cgg gtg gac ctg ttt gtc agt gcg gac gcg aag gcc gct gcc ggc cgg | 1921 |
| Arg Val Asp Leu Phe Val Ser Ala Asp Ala Lys Ala Ala Ala Gly Arg |      |
| 305 310 315                                                     |      |
| atc ctc cgg ctg ctg gat gac gcc gcc ggg gcc aat gcg tcg aag gcc | 1969 |
| Ile Leu Arg Leu Leu Asp Asp Ala Ala Gly Ala Asn Ala Ser Lys Ala |      |
| 320 325 330 335                                                 |      |
| tgg cgc gcg gaa gca ctc aag cgt ctg gcc gaa gga ccc tgc cac cac | 2017 |
| Trp Arg Ala Glu Ala Leu Lys Arg Leu Ala Glu Gly Pro Cys His His |      |
| 340 345 350                                                     |      |
| ccc gcc acc gca gag acc acg gac ggc cgc ctt gac ccc cgg gcg ctt | 2065 |
| Pro Gly Thr Ala Glu Thr Thr Asp Gly Arg Leu Asp Pro Arg Ala Leu |      |
| 355 360 365                                                     |      |
| gct tcg gca ctg gat gcc gtc ctg ccg gaa cgc cgc acc gtg gtc cag | 2113 |
| Ala Ser Ala Leu Asp Ala Val Leu Pro Glu Arg Arg Thr Val Val Gln |      |
| 370 375 380                                                     |      |
| gac ggc ggg cac ttc ctg ggc tgg gca ccc atg tac tgg cgc atc ccc | 2161 |
| Asp Gly Gly His Phe Leu Gly Trp Ala Pro Met Tyr Trp Arg Ile Pro |      |
| 385 390 395                                                     |      |

cgt cct cag gac ctg gtc atg gtg ggg acc gcg tac cag tcg atc ggg 2209  
 Arg Pro Gln Asp Leu Val Met Val Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Ile Gly  
 400 405 410 415  
 ctt ggc ctg gcc agc gcc gtg ggg gcg tcc cgg gcc gtg gac gac ggc 2257  
 Leu Gly Leu Ala Ser Ala Val Gly Ala Ser Arg Ala Val Asp Asp Gly  
 420 425 430  
 aat atc ctg gtg ctg gcg gcg ggc gac ggc gga ttc ctg atg ggc ctg 2305  
 Asn Ile Leu Val Leu Ala Ala Gly Asp Gly Gly Phe Leu Met Gly Leu  
 435 440 445  
 tcc gac ctg gaa tcg ctc gtg ggc gcg gcg agc agc gcc gtc gtg gtg 2353  
 Ser Asp Leu Glu Ser Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val  
 450 455 460  
 atc tac aac gac gcc gcc tac ggg gcc gag atc cat cag tac ggc tca 2401  
 Ile Tyr Asn Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser  
 465 470 475  
 cgg ggg ctc acc gaa aag ccc atg ctg atc ccc gaa gtg gac ttc agc 2449  
 Arg Gly Leu Thr Glu Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser  
 480 485 490 495  
 ggg att gcc cgc gcg atc ggg gcg gaa tcc gca atc atc cgc aag ctg 2497  
 Gly Ile Ala Arg Ala Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu  
 500 505 510  
 tcg gac ctc tcc gcg ctc acg gac tgg atc gag gcc ggc gcc agg gga 2545  
 Ser Asp Leu Ser Ala Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly  
 515 520 525  
 acc ttc gtg gcc gac tgc cgc atc acc tca agc gtc cgg gcc ccg tgg 2593  
 Thr Phe Val Ala Asp Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp  
 530 535 540  
 ctg agc gaa tgg atg agg gcc tcg caa gcg gcg aag gag gcg gtg gcg 2641  
 Leu Ser Glu Trp Met Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala  
 545 550 555  
 ggc tag ggccggcctc gtcgaaatgc cgccctccaa cccaactcag taccagctca 2697  
 Gly  
 560  
 gggcggttctc agggctggga acgccctgag ctgctactca tttgttcgaa ctcgagggtcg 2757  
 acggtatcga taagcttgat atcgaattcc tgcagcccgg gggatccact aggggatccc 2817  
 ccgatccgcg tttgtgtttt ctgggtttct cacttaagcg tctgcgtttt acttttgtat 2877  
 tgggtttggc gtttagtagt ttgcggtagc gttcttgta tgtgtaatta cgctttttct 2937  
 tcttgcttca gcagtttcgg ttgaaatata aatcgaatca agtttcaactt tatcagcggtt 2997  
 gttttaaatt ttggcattaa attggtgaaa attgcttcaa ttttgtatct aaatagaaga 3057  
 gacaacatga aattcgactt ttgacctcaa atcttcgaac atttatttcc tgatttcacg 3117  
 atggatgagg ataacgaaag ggcggttcct atgtccggga aagttcccgt agaagacaat 3177  
 gagcaaagct actgaaacgc ggacacgacg tcgcattggt acggatatga gttaaaccga 3237  
 ctcaattcct ttattaagac ataaaccgat tttggttaaa gtgtaacagt gagctgatat 3297  
 aaaaccgaaa caaaccggta caagtttgat tgagcaactt gatgacaaac ttcagaatth 3357  
 tggttattga atgaaaatca tagtctaate gtaaaaaatg tacagaagaa aagctagagc 3417

agaacaaaga ttctatatc tggttccaat ttatcatcgc tttacgtcc ctcagatttg 3477  
 atcgggctgc aggaattcgg cctgactgat catttaaaca ctagttctag agcggccgcc 3537  
 accgcggtgg ag 3549

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 241

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: cassette d'expression

&lt;400&gt; 16

Leu Arg Leu Leu Asp Asp Ala Ala Gly Ala Asn Ala Ser Lys Ala Trp  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Glu Ala Leu Lys Arg Leu Ala Glu Gly Pro Cys His His Pro  
 20 25 30  
 Gly Thr Ala Glu Thr Thr Asp Gly Arg Leu Asp Pro Arg Ala Leu Ala  
 35 40 45  
 Ser Ala Leu Asp Ala Val Leu Pro Glu Arg Arg Thr Val Val Gln Asp  
 50 55 60  
 Gly Gly His Phe Leu Gly Trp Ala Pro Met Tyr Trp Arg Ile Pro Arg  
 65 70 75 80  
 Pro Gln Asp Leu Val Met Val Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Ile Gly Leu  
 85 90 95  
 Gly Leu Ala Ser Ala Val Gly Ala Ser Arg Ala Val Asp Asp Gly Asn  
 100 105 110  
 Ile Leu Val Leu Ala Ala Gly Asp Gly Gly Phe Leu Met Gly Leu Ser  
 115 120 125  
 Asp Leu Glu Ser Leu Val Gly Ala Ala Ser Ser Ala Val Val Val Ile  
 130 135 140  
 Tyr Asn Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Glu Ile His Gln Tyr Gly Ser Arg  
 145 150 155 160  
 Gly Leu Thr Glu Lys Pro Met Leu Ile Pro Glu Val Asp Phe Ser Gly  
 165 170 175  
 Ile Ala Arg Ala Ile Gly Ala Glu Ser Ala Ile Ile Arg Lys Leu Ser  
 180 185 190  
 Asp Leu Ser Ala Leu Thr Asp Trp Ile Glu Ala Gly Ala Arg Gly Thr  
 195 200 205  
 Phe Val Ala Asp Cys Arg Ile Thr Ser Ser Val Arg Ala Pro Trp Leu  
 210 215 220  
 Ser Glu Trp Met Arg Ala Ser Gln Ala Ala Lys Glu Ala Val Ala Gly  
 225 230 235 240

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 2838

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: cassette

## d'expression

<220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(807)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (847)..(2538)

<220>  
 <221> terminator  
 <222> (2539)..(2838)

<400> 17  
 ggc ccc ccc cct cgag ccc caca gat gg ttaga gag gct tacg cag cag gtct cat caa gacg 60  
 atct acccga gca ata atct ccagg aaatc aaata ccttc cca aga aggt taa agatgca 120  
 gtcaaa agat tcagg actaa ctg cat caag aac acagaga aag atatatatt tct caa gacg 180  
 aga agt acta ttcc agtatg gac gat tcaa ggctt gcttc acaa accaag gca agtaata 240  
 gag att ggag tct ctaaaaa ggtag ttccc act gaatcaa aggc catgga gtcaaa gatt 300  
 caa atagagg accta acaga actc gccgta aag actggcg aac agttcat acag agtctc 360  
 ttac gactca atgaca agaa gaaa atcttc gtcaac atgg tgg agcacga cac acttgtc 420  
 tact ccaaaa atat caaaga tac agtctca gaag accaaa ggg caattga gacttttcaa 480  
 caa agggtaa tatcc ggaaa cctcctcgga ttcc attgcc cag ctatctg tcactttatt 540  
 gtga agatag tggaaa agga aggtggctcc tacaa atgcc atc attgcca taa aggaaaag 600  
 gcc atcgttg aag atgcctc tgccgacagt ggtcccaaag atgg accccc accc acgagg 660  
 agc atcgttg aaaa agaaga cgttccaacc acgtcttcaa agca agtgga ttgatgtgat 720  
 atctcc actg acgta aggga tgacgcacaa tccc actatc cttcgcaaga cccttctct 780  
 atata aggaa gttc atttca ttgg agaga acac gggggga ctct agagga tcag aggacg 840  
 aacaac atg tcc cac ccc gcc atc tcc ctg caa gcg ctg cgc ggc agc 888  
     Met Ser His Pro Ala Ile Ser Leu Gln Ala Leu Arg Gly Ser  
     1                    5                    10  
 ggc gca gac ata cag tcc atc cac atc ccc tac gag cgc cat gcc gac 936  
 Gly Ala Asp Ile Gln Ser Ile His Ile Pro Tyr Glu Arg His Ala Asp  
     15                    20                    25                    30  
 cag gac gcc ggt gcg gac acg ccc gcc cgg cat ccc gtc gtc atc gtc 984  
 Gln Asp Ala Gly Ala Asp Thr Pro Ala Arg His Pro Val Val Ile Val  
     35                    40                    45  
 ggc gcc ggc ccc gtg ggc ctg tgc ctg gcc atc gac ctg gcc cag cgc 1032  
 Gly Ala Gly Pro Val Gly Leu Ser Leu Ala Ile Asp Leu Ala Gln Arg  
     50                    55                    60  
 ggc cag cgc gtg gtg ctg ctg gac aac gac tgc cgg ctg tcc acg ggc 1080  
 Gly Gln Arg Val Val Leu Leu Asp Asn Asp Cys Arg Leu Ser Thr Gly  
     65                    70                    75  
 tcg cgc gcc atc tgc ttt tcc aag cgc acg ctg gag atc tgg gac cgc 1128  
 Ser Arg Ala Ile Cys Phe Ser Lys Arg Thr Leu Glu Ile Trp Asp Arg  
     80                    85                    90  
 ctg gcc gtg ggc cag ccc atg gtg gac aag gcc gtg tcc tgg aac ctg 1176

|           |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |            |      |
|-----------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|------------|------|
| Leu<br>95 | Gly | Val | Gly | Gln | Pro<br>100 | Met | Val | Asp | Lys | Gly<br>105 | Val | Ser | Trp | Asn | Leu<br>110 |      |
| ggc       | aag | gtc | ttc | ttc | aag        | gac | cag | ccg | ctg | tac        | cgc | ttc | gac | ctg | ctg        | 1224 |
| Gly       | Lys | Val | Phe | Phe | Lys        | Asp | Gln | Pro | Leu | Tyr        | Arg | Phe | Asp | Leu | Leu        |      |
|           |     |     |     | 115 |            |     |     |     | 120 |            |     |     |     | 125 |            |      |
| ccc       | gag | gac | ggc | cac | gag        | cgc | ccg | gcc | ttc | atc        | aac | ctg | cag | cag | tac        | 1272 |
| Pro       | Glu | Asp | Gly | His | Glu        | Arg | Pro | Ala | Phe | Ile        | Asn | Leu | Gln | Gln | Tyr        |      |
|           |     |     | 130 |     |            |     |     | 135 |     |            |     |     | 140 |     |            |      |
| tac       | gcc | gag | gcc | tat | ctg        | gtc | gag | cgc | gca | ctg        | cag | ctg | ccg | ctg | atc        | 1320 |
| Tyr       | Ala | Glu | Ala | Tyr | Leu        | Val | Glu | Arg | Ala | Leu        | Gln | Leu | Pro | Leu | Ile        |      |
|           |     | 145 |     |     |            |     | 150 |     |     |            |     | 155 |     |     |            |      |
| gac       | ctg | cgc | tgg | cac | agc        | aag | gtc | acg | gca | ctg        | gag | ccg | cag | gcc | gag        | 1368 |
| Asp       | Leu | Arg | Trp | His | Ser        | Lys | Val | Thr | Ala | Leu        | Glu | Pro | Gln | Ala | Glu        |      |
|           |     |     |     |     |            | 165 |     |     |     |            | 170 |     |     |     |            |      |
| ggc       | gcg | ctg | ctg | acc | gtg        | gag | acg | cct | gac | ggc        | agc | tac | cgc | atc | gat        | 1416 |
| Gly       | Ala | Leu | Leu | Thr | Val        | Glu | Thr | Pro | Asp | Gly        | Ser | Tyr | Arg | Ile | Asp        |      |
| 175       |     |     |     |     | 180        |     |     |     |     | 185        |     |     |     |     | 190        |      |
| gcg       | caa | tgg | gtc | ctg | gcc        | tgc | gat | ggc | tgc | cgc        | tgc | ccg | ctg | cgc | ggc        | 1464 |
| Ala       | Gln | Trp | Val | Leu | Ala        | Cys | Asp | Gly | Ser | Arg        | Ser | Pro | Leu | Arg | Gly        |      |
|           |     |     |     | 195 |            |     |     | 200 |     |            |     |     |     | 205 |            |      |
| ctg       | ctg | ggc | cag | gaa | agc        | cat | ggc | cgc | atc | ttc        | cgc | gac | cgc | ttc | ctg        | 1512 |
| Leu       | Leu | Gly | Gln | Glu | Ser        | His | Gly | Arg | Ile | Phe        | Arg | Asp | Arg | Phe | Leu        |      |
|           |     |     | 210 |     |            |     |     | 215 |     |            |     |     | 220 |     |            |      |
| atc       | gcc | gac | gtg | aag | atg        | cac | gcc | gaa | ttc | ccc        | acc | gag | cgc | tgg | ttc        | 1560 |
| Ile       | Ala | Asp | Val | Lys | Met        | His | Ala | Glu | Phe | Pro        | Thr | Glu | Arg | Trp | Phe        |      |
|           |     | 225 |     |     |            |     | 230 |     |     |            |     | 235 |     |     |            |      |
| tgg       | ttc | gac | ccg | ccc | ttc        | cac | ccg | ggc | cag | agc        | gtg | ctg | ctg | cac | cgc        | 1608 |
| Trp       | Phe | Asp | Pro | Pro | Phe        | His | Pro | Gly | Gln | Ser        | Val | Leu | Leu | His | Arg        |      |
|           |     | 240 |     |     |            | 245 |     |     |     |            | 250 |     |     |     |            |      |
| cag       | ccc | gac | gat | gtc | tgg        | cgc | atc | gac | ttc | cag        | ctg | ggc | tgg | gac | gcg        | 1656 |
| Gln       | Pro | Asp | Asp | Val | Trp        | Arg | Ile | Asp | Phe | Gln        | Leu | Gly | Trp | Asp | Ala        |      |
| 255       |     |     |     |     | 260        |     |     |     |     | 265        |     |     |     |     | 270        |      |
| gac       | ccc | gag | gaa | gag | aaa        | aag | ccc | gag | aac | atc        | gtg | ccg | cgc | atc | cgc        | 1704 |
| Asp       | Pro | Glu | Glu | Glu | Lys        | Lys | Pro | Glu | Asn | Ile        | Val | Pro | Arg | Ile | Arg        |      |
|           |     |     |     | 275 |            |     |     |     | 280 |            |     |     |     | 285 |            |      |
| gcc       | ctg | ctg | ggc | aag | gac        | gcg | ccc | ttc | gag | ctg        | gaa | tgg | gcc | agc | gtc        | 1752 |
| Ala       | Leu | Leu | Gly | Lys | Asp        | Ala | Pro | Phe | Glu | Leu        | Glu | Trp | Ala | Ser | Val        |      |
|           |     |     | 290 |     |            |     |     | 295 |     |            |     |     | 300 |     |            |      |
| tac       | acc | ttc | gcc | tgc | ctg        | cgc | atg | gac | cgc | ttc        | gtc | cat | ggc | cgc | gtg        | 1800 |
| Tyr       | Thr | Phe | Ala | Cys | Leu        | Arg | Met | Asp | Arg | Phe        | Val | His | Gly | Arg | Val        |      |
|           |     | 305 |     |     |            |     | 310 |     |     |            |     | 315 |     |     |            |      |
| gtc       | ttt | gcg | ggc | gac | agc        | gcc | cac | ggc | gtc | tgc        | ccg | ttt | ggc | gca | cgc        | 1848 |
| Val       | Phe | Ala | Gly | Asp | Ser        | Ala | His | Gly | Val | Ser        | Pro | Phe | Gly | Ala | Arg        |      |
|           |     | 320 |     |     |            | 325 |     |     |     |            | 330 |     |     |     |            |      |
| ggc       | gcc | aac | agc | ggc | gtg        | cag | gat | gcc | gag | aac        | ctg | gca | tgg | aag | ctg        | 1896 |
| Gly       | Ala | Asn | Ser | Gly | Val        | Gln | Asp | Ala | Glu | Asn        | Leu | Ala | Trp | Lys | Leu        |      |
| 335       |     |     |     |     | 340        |     |     |     |     | 345        |     |     |     |     | 350        |      |
| gac       | cgc | gtg | ctg | cgc | ggc        | cag | gcc | gat | gcc | tgc        | ctg | atc | gcc | acc | tac        | 1944 |
| Asp       | Arg | Val | Leu | Arg | Gly        | Gln | Ala | Asp | Ala | Ser        | Leu | Ile | Ala | Thr | Tyr        |      |
|           |     |     |     | 355 |            |     |     | 360 |     |            |     |     |     | 365 |            |      |
| ggc       | gcc | gag | cgc | gaa | tac        | gcg | gcc | gac | gag | aac        | atc | cgc | aac | tcc | acg        | 1992 |

Gly Ala Glu Arg Glu Tyr Ala Ala Asp Glu Asn Ile Arg Asn Ser Thr  
 370 375 380  
 cgc gcc acc gac ttc atc acg ccc aag agc gag atc agc cgc ctg ttt 2040  
 Arg Ala Thr Asp Phe Ile Thr Pro Lys Ser Glu Ile Ser Arg Leu Phe  
 385 390 395  
 cgc gac gcc gtg ctg gac ctg gcg cgc gac cat gaa ttc gcg cgc cgc 2088  
 Arg Asp Ala Val Leu Asp Leu Ala Arg Asp His Glu Phe Ala Arg Arg  
 400 405 410  
 atc gtc aac agc ggg cgg ctg tcc gtg ccg gcc acg ctg cac ggc tcc 2136  
 Ile Val Asn Ser Gly Arg Leu Ser Val Pro Ala Thr Leu His Gly Ser  
 415 420 425 430  
 gcg ctc aac acg cct gac acc gac acc ttc gac gga acg cag ctg ccc 2184  
 Ala Leu Asn Thr Pro Asp Thr Asp Thr Phe Asp Gly Thr Gln Leu Pro  
 435 440 445  
 ggc gcc gtg ctg gcc gat gcg ccc atg cgc cgg ccc ggc gca gac ggc 2232  
 Gly Ala Val Leu Ala Asp Ala Pro Met Arg Arg Pro Gly Ala Asp Gly  
 450 455 460  
 acg gcc tgg ctg ctg cgc gca ctg gga ccg gac ttc acg ctg ctg cac 2280  
 Thr Ala Trp Leu Leu Arg Ala Leu Gly Pro Asp Phe Thr Leu Leu His  
 465 470 475  
 ttc gac ccc acg ccc gcc tgg gcg cag gcg ctg ccc ggc gtg ctc aac 2328  
 Phe Asp Pro Thr Pro Ala Trp Ala Gln Ala Leu Pro Gly Val Leu Asn  
 480 485 490  
 ctg tcc atc gcg gcc gag ggc gag gcc cat gcg cca gac gcc gac ctc 2376  
 Leu Ser Ile Ala Ala Glu Gly Glu Ala His Ala Pro Asp Ala Asp Leu  
 495 500 505 510  
 atc gat gcg cgc ggc ctg gcg gcc aaa cgc ctg gat gca cgc ccc ggc 2424  
 Ile Asp Ala Arg Gly Leu Ala Ala Lys Arg Leu Asp Ala Arg Pro Gly  
 515 520 525  
 acc agc tac ctg ctg cgg cct gac cag cat gtc tgc gcg cgc tgg cgc 2472  
 Thr Ser Tyr Leu Leu Arg Pro Asp Gln His Val Cys Ala Arg Trp Arg  
 530 535 540  
 cgc ccc gac gaa gcc agc gtg cgc gcc gcg ctg caa aga gcc tgc ggc 2520  
 Arg Pro Asp Glu Ala Ser Val Arg Ala Ala Leu Gln Arg Ala Cys Gly  
 545 550 555  
 gcc gcc gcc acg gcc tga acctcttaag cttatcgata ccgtcgacga 2568  
 Ala Ala Ala Thr Ala  
 560  
 atttccccga tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg 2628  
 gtcttgcat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca 2688  
 tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca 2748  
 ttttaacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg 2808  
 tgtcatctat gttcctaggt cggaattgc 2838  
 <210> 18  
 <211> 284  
 <212>  
 <213> Séquence artificielle  
 <223> Description de la séquence artificielle: cassette  
 d'expression

&lt;400&gt; 18

Ile Val Pro Arg Ile Arg Ala Leu Leu Gly Lys Asp Ala Pro Phe Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Glu Trp Ala Ser Val Tyr Thr Phe Ala Cys Leu Arg Met Asp Arg  
 20 25 30  
 Phe Val His Gly Arg Val Val Phe Ala Gly Asp Ser Ala His Gly Val  
 35 40 45  
 Ser Pro Phe Gly Ala Arg Gly Ala Asn Ser Gly Val Gln Asp Ala Glu  
 50 55 60  
 Asn Leu Ala Trp Lys Leu Asp Arg Val Leu Arg Gly Gln Ala Asp Ala  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Ile Ala Thr Tyr Gly Ala Glu Arg Glu Tyr Ala Ala Asp Glu  
 85 90 95  
 Asn Ile Arg Asn Ser Thr Arg Ala Thr Asp Phe Ile Thr Pro Lys Ser  
 100 105 110  
 Glu Ile Ser Arg Leu Phe Arg Asp Ala Val Leu Asp Leu Ala Arg Asp  
 115 120 125  
 His Glu Phe Ala Arg Arg Ile Val Asn Ser Gly Arg Leu Ser Val Pro  
 130 135 140  
 Ala Thr Leu His Gly Ser Ala Leu Asn Thr Pro Asp Thr Asp Thr Phe  
 145 150 155 160  
 Asp Gly Thr Gln Leu Pro Gly Ala Val Leu Ala Asp Ala Pro Met Arg  
 165 170 175  
 Arg Pro Gly Ala Asp Gly Thr Ala Trp Leu Leu Arg Ala Leu Gly Pro  
 180 185 190  
 Asp Phe Thr Leu Leu His Phe Asp Pro Thr Pro Ala Trp Ala Gln Ala  
 195 200 205  
 Leu Pro Gly Val Leu Asn Leu Ser Ile Ala Ala Glu Gly Glu Ala His  
 210 215 220  
 Ala Pro Asp Ala Asp Leu Ile Asp Ala Arg Gly Leu Ala Ala Lys Arg  
 225 230 235 240  
 Leu Asp Ala Arg Pro Gly Thr Ser Tyr Leu Leu Arg Pro Asp Gln His  
 245 250 255  
 Val Cys Ala Arg Trp Arg Arg Pro Asp Glu Ala Ser Val Arg Ala Ala  
 260 265 270  
 Leu Gln Arg Ala Cys Gly Ala Ala Ala Thr Ala  
 275 280

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 1839

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: cassette  
 d'expression

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1)..(547)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (574)..(1539)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; terminator

&lt;222&gt; (1540)..(1839)

&lt;400&gt; 19

```

ccccctcgag gtcgacgcta ttgatcagct tccagaaggt aattatccaa gatgtagcat 60
caagaatcca atgtttacgg gaaaaactat ggaagtatta tgtgagotca gcaagaagca 120
gatcaatatg cggcacatat gcaacctatg ttcaaaaatg aagaatgtac agatacaaga 180
tcctatactg ccagaatacg aagaagaata cgtagaaatt gaaaaagaag aaccaggcga 240
agaaaagaat cttgaagacg taagcactga cgacaacaat gaaaagaaga agataaggctc 300
ggtgattgtg aaagagacat agaggacaca tgtaagggtg aaaatgtaag ggcggaagt 360
aaccttatca caaaggaatc ttatcccca ctacttatcc ttttatattt ttccgtgtca 420
tttttgccct tgagttttcc tatataagga accaagttcg gcatttgtga aaacaagaaa 480
aaatttggtg taagctatct tctttgaagt actgaggata caacttcaga gaaatttgta 540
agtttgtaga tctgaattcg atgcaggatg cac atg tcc acc aag acc ttt gcc 594
                               Met Ser Thr Lys Thr Phe Ala
                               1           5

tcc gcc gcc gac ctc gaa atc aag cag gtc agc ttc gac aag ctc tcc 642
Ser Ala Ala Asp Leu Glu Ile Lys Gln Val Ser Phe Asp Lys Leu Ser
          10           15           20

gag cac gcc tat gcc tac acg gcc gaa ggc gac ccc aac acc ggc atc 690
Glu His Ala Tyr Ala Tyr Thr Ala Glu Gly Asp Pro Asn Thr Gly Ile
          25           30           35

atc att ggc gac gac gcg gtg atg gtg atc gac acc cag gcc acg ccc 738
Ile Ile Gly Asp Asp Ala Val Met Val Ile Asp Thr Gln Ala Thr Pro
          40           45           50           55

gtc atg gcc cag gac gtg atc cgc cgc atc cgt gag gtc acg gac aag 786
Val Met Ala Gln Asp Val Ile Arg Arg Ile Arg Glu Val Thr Asp Lys
          60           65           70

ccc atc aag tac gtg acg ctg tgc cac tac cac gcg gtg cgc gtg ctg 834
Pro Ile Lys Tyr Val Thr Leu Ser His Tyr His Ala Val Arg Val Leu
          75           80           85

ggc gcc tcg gcc ttc ttc gcg gaa ggc gcc gaa cac atc att gcc agc 882
Gly Ala Ser Ala Phe Phe Ala Glu Gly Ala Glu His Ile Ile Ala Ser
          90           95           100

cag gac acc tac gac ctc atc gtg gag cgc ggc gag cag gac aag gcc 930
Gln Asp Thr Tyr Asp Leu Ile Val Glu Arg Gly Glu Gln Asp Lys Ala
          105           110           115

agc gag atc ggc cgc ttt ccc cgc ctg ttc cag aac gtg gaa agc gtg 978
Ser Glu Ile Gly Arg Phe Pro Arg Leu Phe Gln Asn Val Glu Ser Val
          120           125           130           135

ccc gat ggc atg acc tgg ccc acc ctc acc ttc acc ggc aag atg acg 1026
Pro Asp Gly Met Thr Trp Pro Thr Leu Thr Phe Thr Gly Lys Met Thr
          140           145           150

```



ctg tgg ctg ggc aag ctg gaa gtg cag atc ctg cag ctg ggc cgc ggc 1074  
 Leu Trp Leu Gly Lys Leu Glu Val Gln Ile Leu Gln Leu Gly Arg Gly  
 155 160 165

cac acc aag ggc gac acc gtg gtc tgg ctg ccc cag gac aag gtg ctg 1122  
 His Thr Lys Gly Asp Thr Val Val Trp Leu Pro Gln Asp Lys Val Leu  
 170 175 180

ttc agc ggc gac ctg gtg gag ttc ggc gcc acg ccc tat gcg ggc gat 1170  
 Phe Ser Gly Asp Leu Val Glu Phe Gly Ala Thr Pro Tyr Ala Gly Asp  
 185 190 195

gcc tac ttc cag gac tgg ccg cac acg ctg gac gcc atc gcc gcc ctg 1218  
 Ala Tyr Phe Gln Asp Trp Pro His Thr Leu Asp Ala Ile Ala Ala Leu  
 200 205 210 215

cag ccc gaa aag ctc gtg ccc ggc cgg ggc gcc gcg ctg cag acg ccg 1266  
 Gln Pro Glu Lys Leu Val Pro Gly Arg Gly Ala Ala Leu Gln Thr Pro  
 220 225 230

gcc gag gtg cag gcc ggc ctg gcc ggc acg cgc gac ttc atc agc gac 1314  
 Ala Glu Val Gln Ala Gly Leu Ala Gly Thr Arg Asp Phe Ile Ser Asp  
 235 240 245

ctg tgg acc gag gtc aag gcc ggc gcc gat gcc cag cag gac ctg cgc 1362  
 Leu Trp Thr Glu Val Lys Ala Gly Ala Asp Ala Gln Gln Asp Leu Arg  
 250 255 260

aag gtc tac gag gcc gcc ttc gcc aag ctg cag ccc aag tac ggc cag 1410  
 Lys Val Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Lys Leu Gln Pro Lys Tyr Gly Gln  
 265 270 275

tgg gtg atc ttc aac cac tgc atg ccc ttc gat gtg acc cgc gcc tat 1458  
 Trp Val Ile Phe Asn His Cys Met Pro Phe Asp Val Thr Arg Ala Tyr  
 280 285 290 295

gac gag gca tcg ggc cac gcc gac cca cgc atc tgg acc gcc gag cgc 1506  
 Asp Glu Ala Ser Gly His Ala Asp Pro Arg Ile Trp Thr Ala Glu Arg  
 300 305 310

gac cgc cag atg tgg ctg gcg ctc gaa gcc tga tgcaagctta tcgataccgt 1559  
 Asp Arg Gln Met Trp Leu Ala Leu Glu Gly  
 315 320

cgacgaattt ccccgatcgt tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg 1619  
 ttgccggtct tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa 1679  
 ttaacatgta atgcatgacg ttatttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgcaat 1739  
 tatacattta atacgcgata gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc 1799  
 gcgcggtgtc atctatgtta ctagatcggg aattgcggcc 1839

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 142

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: cassette d'expression

&lt;400&gt; 20

Lys Val Leu Phe Ser Gly Asp Leu Val Glu Phe Gly Ala Thr Pro Tyr  
 1 5 10 15

Ala Gly Asp Ala Tyr Phe Gln Asp Trp Pro His Thr Leu Asp Ala Ile

20 25 30  
 Ala Ala Leu Gln Pro Glu Lys Leu Val Pro Gly Arg Gly Ala Ala Leu  
 35 40 45  
 Gln Thr Pro Ala Glu Val Gln Ala Gly Leu Ala Gly Thr Arg Asp Phe  
 50 55 60  
 Ile Ser Asp Leu Trp Thr Glu Val Lys Ala Gly Ala Asp Ala Gln Gln  
 65 70 75 80  
 Asp Leu Arg Lys Val Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Lys Leu Gln Pro Lys  
 85 90 95  
 Tyr Gly Gln Trp Val Ile Phe Asn His Cys Met Pro Phe Asp Val Thr  
 100 105 110  
 Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ser Gly His Ala Asp Pro Arg Ile Trp Thr  
 115 120 125  
 Ala Glu Arg Asp Arg Gln Met Trp Leu Ala Leu Glu Gly  
 130 135 140

<210> 21  
 <211> 4677  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: cassette  
 d'expression

<400> 21  
 cccctcgag gtcgacggtat ttgatcagct tccagaaggt aattatccaa gatgtagcat 60  
 caagaatcca atgtttacgg gaaaaactat ggaagtatta tgtgagctca gcaagaagca 120  
 gatcaatatg cggcacatat gcaacctatg ttcaaaaatg aagaatgtac agatacaaga 180  
 tcttatactg ccagaatacg aagaagaata cgtagaaatt gaaaaagaag aaccaggcga 240  
 agaaaagaat cttgaagacg taagcactga cgacaacaat gaaaagaaga agataaggtc 300  
 ggtgattgtg aaagagacat agaggacaca tgtaagggtg aaaatgtaag ggcggaaagt 360  
 aaccttatca caaaggaatc ttatccccc ctacttatcc ttttatattt ttccgtgtca 420  
 tttttgcctt tgagttttcc tatataagga accaagttcg gcatttgtga aaacaagaaa 480  
 aaatttggtg taagctattt tctttgaagt actgaggata caacttcaga gaaatttgta 540  
 agtttgtaga tctgaattcg atgcaggatg cacatgtcca ccaagacctt tgcctccgcc 600  
 gccgacctcg aatcaagca ggtcagcttc gacaagctct ccgagcacgc ctatgcctac 660  
 acggccgaag gcgaccccaa caccggcatc atcattggcg acgacgcggt gatggtgatc 720  
 gacaccagg ccacgcccgt catggcccag gacgtgatcc gccgcatccg tgaggtaacg 780  
 gacaagccca tcaagtacgt gacgctgtcg cactaccacg cgggtgcgct gctgggagcc 840  
 tcggccttct tcgcggaagg cgccgaacac atcattgcca gccaggacac ctacgacctc 900  
 atcgtggagc gcggcgagca ggacaaggcc agcgagatcg gccgctttcc ccgcctgttc 960  
 cagaacgtgg aaagcgtgcc cgatggcatg acctggccca cctcacctt caccggcaag 1020

atgacgctgt ggctgggcaa gctggaagtg cagatcctgc agctgggccc cgccacacc 1080  
aagggcgaca ccgtggtctg gctgccccag gacaaggtgc tgttcagcgg cgacctggtg 1140  
gagttcggcg ccacgcccta tgcgggcat gcctacttcc aggactggcc gcaacacgtg 1200  
gacgccatcg ccgccctgca gcccgaaaag ctctgccccg gccggggcgc cgcgctgcag 1260  
acgccggccc aggtgcaggc cggcctggcc ggcacgcgcg acttcatcag cgacctgtgg 1320  
accgaggtca aggccggcgc cgatgccag caggacctgc gcaaggtcta cgaggccgcc 1380  
ttcgccaagc tgcagcccaa gtacggccag tgggtgatct tcaaccactg catgoccttc 1440  
gatgtgacct gcgcctatga cgaggcatcg ggccacgccg acccacgcat ctggaccgcc 1500  
gagcgcgacc gccagatgtg gctggcgctc gaaggetgat gcaagcttat cgataccgtc 1560  
gacgaatttc ccgatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt 1620  
tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat 1680  
taacatgtaa tgcagacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgaatt 1740  
atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg 1800  
cgcggtgtca tctatgttac tagatcggga attgcggccc cccctcgagc ccacagatgg 1860  
ttagagaggc ttacgcagca ggtctcatca agacgatcta cccgagcaat aatctccagg 1920  
aaatcaaata ccttcccaag aaggttaaag atgcagtcaa aagattcagg actaactgca 1980  
tcaagaacac agagaaagat atatttctca agatcagaag tactattcca gtatggacga 2040  
ttcaaggctt gcttcacaaa ccaaggcaag taatagagat tggagtctct aaaaaggtag 2100  
ttccactga atcaaaggcc atggagtcaa agattcaaat agaggaccta acagaactcg 2160  
ccgtaaagac tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa 2220  
tcttcgtcaa catggtggag cacgacacac ttgtctactc caaaaatata aaagatacag 2280  
tctcagaaga ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc 2340  
tcggattcca ttgccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaagggtg 2400  
gctctacaa atgcatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg 2460  
acagtggctc caaagatgga ccccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc 2520  
caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg 2580  
cacaatccca ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagttca ttctatttgg 2640  
agagaacacg ggggactcta gaggatcaga ggacgaacaa catgtccac cccgccatct 2700  
ccctgcaagc gctgcgcggc agcggcgag acatacagtc catccacatc ccctacgagc 2760  
gccatgccga ccaggacgcc ggtgcggaca cgcgcggcgc gcatcccgtc gtcacgtcgc 2820  
gcgcggccc cgtgggcctg tcgctggcca tcgacctggc ccagcgcggc cagcgcgtgg 2880  
tgctgctgga caacgactgc cggctgtcca cgggctcgcg cgcctctgc tttccaagc 2940  
gcacgctgga gatctgggac cgcctgggcg tgggccagcc catggtggac aagggcgtgt 3000  
cctggaacct gggcaaggtc ttcttcaagg accagccgct gtaccgcttc gacctgctgc 3060

ccgaggacgg ccacgagcgc ccggccttca tcaacctgca gcagtactac gccgaggcct 3120  
 atctgggtcga gcgcgcactg cagctgccgc tgatcgacct gcgctggcac agcaagggtca 3180  
 cggcactgga gccgcaggcc gagggcgcgc tgetgaccgt ggagacgcct gacggcagct 3240  
 accgcatcga tgcgcaatgg gtccctggcct gcgatggctc gcgctcgccg ctgcgcggcc 3300  
 tgctgggcca ggaaagccat ggccgcacat tccgcgaccg cttcctgac gccgacgtga 3360  
 agatgcacgc cgaattcccc accgagcgct ggttctgggt cgaccgcgcc ttccaccgg 3420  
 gccagagcgt gctgctgcac cgcagcccg acgatgtctg gcgcatcgac ttccagctgg 3480  
 gctgggacgc ggaccccgag gaagagaaaa agcccagaaa catcgtgccg cgcacccgcg 3540  
 ccctgctggg caaggacgcg cccttcgagc tggaaatggg cagcgtctac accttcgcct 3600  
 gcctgcgcac ggaccgcttc gtccatggcc gcgtggtctt tgccggcgac agcgcgccacg 3660  
 gcgtctcgcc gtttggcgca cgcggcgcca acagcggcgt gcaggatgcc gagaacctgg 3720  
 catggaagct ggaccgcgtg ctgcgcggcc aggcgcgatgc ctgcgtgac gccacctacg 3780  
 gcgccgagcg cgaatacgcg gccgacgaga acatccgcaa ctccacgcgc gccaccgact 3840  
 tcatcacgcc caagagcgag atcagccgcc tgtttcgga cgcctgctg gacctggcg 3900  
 gcgaccatga attcgcgcg cgcacgtca acagcggcg gctgtccgtg ccggccacgc 3960  
 tgcacggctc cgcgtcaac acgcctgaca ccgacacctt cgacggaacg cagctgcccg 4020  
 gcgccgtgct ggccgatgcg cccatgcgc ggccggcgcg agacggcacg gcctggctgc 4080  
 tgcgcgact gggaccggac ttcacgtgc tgcaactcga cccacgcgcc gcctggcgcg 4140  
 aggcgtgccc cggcgtgctc aacctgtcca tcgcggccga gggcgaggcc catgcgccag 4200  
 acgccgacct catcgatgcg cgcggcctgg cggccaaacg cctggatgca cgcgccggca 4260  
 ccagctacct gctgcggcct gaccagcatg tctgcgcgcg ctggcgccgc cccgacgaag 4320  
 ccagcgtgcg cgcgcgcgtg caaagagcct gcggcgccgc cgcacggcc tgaacctctt 4380  
 aagcttatcg ataccgtcga cgaatttccc cgcctgttca aacatttggc aataaagttt 4440  
 cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc tgttgaatta 4500  
 cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggtttttat 4560  
 gattagagtc cgcgaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaa 4620  
 ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttcta ggtcgggaat tgccggcc 4677

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 8187

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: cassette d'expression

&lt;400&gt; 22

cccctcgag gtcgacggtg ttgatcagct tccagaaggt aattatccaa gatgtagcat 60  
 caagaatcca atgtttacgg gaaaaactat ggaagtatta tgtgagctca gcaagaagca 120

gatcaatatg cggcacatat gcaacctatg ttcaaaaatg aagaatgtac agatacaaga 180  
tcctatactg ccagaatacg aagaagaata cgtagaaatt gaaaaagaag aacaggcgga 240  
agaaaagaat cttgaagacg taagcactga cgacaacaat gaaaagaaga agataaggtc 300  
ggtgattgtg aaagagacat agaggacaca tgtaaggtgg aaaatgtaag ggcggaaagt 360  
aaccttatca caaaggaatc ttatccccc cttacttatcc ttttatattt ttccgtgtca 420  
tttttgccct tgagttttcc tatataagga accaagttcg gcatttgtga aaacaagaaa 480  
aaatttgggtg taagctattt tctttgaagt actgaggata caacttcaga gaaatttgtg 540  
agtittgtaga tctgaattcg atgcaggatg cacatgtcca ccaagacctt tgcctccgcc 600  
gccgacctcg aaatcaagca ggtcagcttc gacaagctct ccgagcacgc ctatgcctac 660  
acggccgaag gcgaccccaa caccggcatc atcattggcg acgacgcggt gatggtgatc 720  
gacaccagg ccacgcccgt catggcccag gacgtgatcc gccgcatccg tgaggtcacg 780  
gacaagccca tcaagtacgt gacgtgtcg cactaccacg cgggtgcgct gctgggcgcc 840  
tcggccttct tcgcggaagg cgccgaacac atcattgcca gccaggacac ctacgacctc 900  
atcgtggagc gcggcgagca ggacaaggcc agcgagatcg gccgctttcc ccgctgttc 960  
cagaacgtgg aaagcgtgcc cgatggcatg acctggccca ccctcacctt caccggcaag 1020  
atgacgctgt ggctgggcaa gctggaagtg cagatcctgc agctgggccc cgccacacc 1080  
aaggcgaca ccgtggtctg gctgccccag gacaaggtgc tgttcagcgg cgacctggtg 1140  
gagttcggcg ccacgccta tgccggcgat gcctacttcc aggactggcc gcacacgtg 1200  
gacgccatcg ccgcctgca gccgaaaag ctctgccccg gccggggcgc cgcgtgcag 1260  
acgccggcgg aggtgcaggc cggcctggcc ggcacgcgcg acttcacag cgacctgtgg 1320  
accgaggtca aggcgggcgc cgatgcccg caggacctgc gcaaggtcta cgaggccgcc 1380  
ttcgccaagc tgacgccaa gtacggccag tgggtgatct tcaacctg catgcccttc 1440  
gatgtgacct gcgcctatga cgaggcatc ggccacgccg acccacgcat ctggaccgcc 1500  
gagcgcgacc gccagatgtg gctggcgctc gaaggctgat gcaagcttat cgataccgtc 1560  
gacgaatttc cccgatcgtt caaacattg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt 1620  
tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat 1680  
taacatgtaa tgcacgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgaatt 1740  
atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg 1800  
cgcggtgtca tctatgttac tagatcgga attgcggccc cccctcgagc ccacagatgg 1860  
ttagagaggc ttacgcagca ggtctcatca agacgatcta cccgagcaat aatctccagg 1920  
aaatcaaata ccttccaag aaggttaaag atgcagtcaa aagattcagg actaactgca 1980  
tcaagaacac agagaaagat atatttctca agatcagaag tactattcca gtatggacga 2040  
ttcaaggctt gcttcacaaa ccaaggcaag taatagagat tggagtctct aaaaaggtag 2100  
ttcccactga atcaaaggcc atggagtcaa agattcaaat agaggacctc acagaactcg 2160

ccgtaaagac tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa 2220  
tcttcgtcaa catggtggag cagcacacac ttgtctactc caaaaatata aaagatacag 2280  
tctcagaaga ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc 2340  
tcggattcca ttgccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaaggtg 2400  
gtcctacaa atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg 2460  
acagtgggtcc caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc 2520  
caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgatctctc cactgacgta agggatgacg 2580  
cacaatccca ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagttca tttcatttgg 2640  
agagaacacg ggggactcta gaggatcaga ggacgaacaa catgtcccac cccgccatct 2700  
ccctgcaagc gctgcgcggc agcggcgag acatacagtc catccacatc ccctacgagc 2760  
gccatgccga ccaggacgcc ggtgcggaca cggccgccg gcacccgctc gtcacgtcg 2820  
gcgcggccc cgtgggctg tcgtggcca tcgacctggc ccagcgcggc cagcgcgtgg 2880  
tgctgctgga caacgactgc cggctgtcca cgggctcgcg cgccatctgc tttccaagc 2940  
gcacgctgga gatctgggac cgcctgggcg tgggccagcc catggtggac aagggcgtgt 3000  
cctggaacct gggcaaggtc ttctcaagg accagccgct gtaccgcttc gacctgctgc 3060  
ccgaggacgg ccacgagcgc ccggccttca tcaacctgca gcagtactac gccgaggcct 3120  
atctggtcga gcgcgactg cagctgccgc tgatcgacct gcgctggcac agcaagggtca 3180  
cggcactgga gccgcaggcc gagggcgcg tgctgacct ggagacgcct gacggcagct 3240  
accgcatcga tgcgcaatgg gtcctggcct gcgatggctc gcgctcgccg ctgcgcggcc 3300  
tgctgggcca ggaaagccat ggccgcatct tccgcgaccg cttcctgacg gccgacgtga 3360  
agatgcacgc cgaattcccc accgagcgt ggttctggtt cgaccgccc ttccaccgg 3420  
gccagagcgt gctgctgcac cggcagccc acgatgtctg gcgcatcgac ttccagctgg 3480  
gtggggacgc ggaccccgag gaagagaaaa agcccgagaa catcgtgccg cgcacccgcg 3540  
ccctgctggg caaggacgcg cccttcgagc tggaatgggc cagcgtctac accttcgct 3600  
gcctgcgcat ggaccgcttc gtccatggcc gcgtggtctt tgcgggagac agcgcacacg 3660  
gcgtctcgcc gtttggcgca cgcggcgcca acagcggcgt gcaggatgcc gagaacctgg 3720  
catggaagct ggaccgcgtg ctgcgcggcc aggccgatgc ctgctgac gccacctacg 3780  
gcgccgagcg cgaatacgcg gccgacgaga acatccgcaa ctccacgcgc gccaccgact 3840  
tcatacgcg caagagcgag atcagccgcc tgtttcgca cgcgtgctg gacctggcg 3900  
gcgaccatga attcgcgcgc cgcacgtca acagcggcg gctgtccgtg ccggccacgc 3960  
tgacggctc cgcgtcaac acgcctgaca ccgacacct cgacggaacg cagctgccc 4020  
gcgcgtgct ggccgatgcg cccatgcgc ggccggcg agacggcacg gcctggctgc 4080  
tgcgcgact gggaccggac ttcacgtgc tgcacttcga cccacgccc gcctgggcg 4140  
aggcgtgcc cggcgtgct aacctgtcca tcgcggcga gggcgaggcc catgcgccag 4200

acgccgacct catcgatgcg cgcggcctgg cggccaaaacg cctggatgca cgccccggca 4260  
ccagctacct gctgcggcct gaccagcatg tctgcgcgcg ctggcgccgc cccgacgaag 4320  
ccagcgtgcg cgccgcgctg caaagagcct gcggcgccgc cgccacggcc tgaacctctt 4380  
aagcttatcg ataccgtcga cgaatttccc cgatcgttca aacatttggc aataaagttt 4440  
cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc tgttgaatta 4500  
cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggtttttat 4560  
gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa 4620  
ctaggataaa ttatcgcgcg cggtgtcatc tatgttccta ggtcgaggag aaatatgagt 4680  
cgaggcatgg atacactaag ttccctgaa gtgagcatga tctttgatgc tgagatgatt 4740  
cccagagcaa gatagtttgt gctgcaagtg acacaattgt aatgaaacca ccactcaacg 4800  
aatttacttg tggctttgac atgtcgtgtg ctctgtttgt atttgtgagt gccggttgg 4860  
aattattttt gttaatgtga ttttaaaacc tcttatgtaa atagttactt tatctattga 4920  
agtgtgttct tgtggtctat agtttctcaa agggaaatta aaatgttgac atcccattha 4980  
caattgataa cttggtatac aaaaactttg taaatttggg gatatttatg gtcgaaagaa 5040  
ggcaataccc attgtatggt ccaatatcaa tatcaatacg ataacttgat aatactaaca 5100  
tatgattgtc attgtttttc cagtatcaat atacattaag ctactacaaa attagtataa 5160  
atcactatat tataaatctt tttcggttgt aacttgtaat tcgtgggttt ttaaaataaa 5220  
agcatgtgaa aattttcaaa taatgtgatg gcgcaatttt attttccgag ttccaaaata 5280  
ttgccgcttc attaccctaa tttgtggcgc cacatgtaaa aaaaaagacg attcttagtg 5340  
gctatcactg ccatcacgcg gatcactaat atgaaccgtc gattaaaaca gatcgacggg 5400  
ttatacatca ttttattgta cacacggatc gatatctcag ccgttagatt taatatgca 5460  
tctgattgct caaaaaatag actctccgtc tttgctata aaaacaattt cacatcttc 5520  
tcaccctaat ctactcttaa ccgttcttct tctctacag acatcaattt ctctcgactc 5580  
tagaggatcc aagcttatcg atttcgaacc cctcatgact tcaattacag tgtccggccg 5640  
ggtggcgag gtcctcagca gctatgtcag cgatgtgttc ggtgtgatgg gcaacggaaa 5700  
cgtctacttc ctggacgccc ccgagaagga gggcctccgc ttcacggccg tacgccatga 5760  
aggtgccgcc atcgcgcgcg cggaagccta ctatcgggca tccgggcgcc tggcggcggg 5820  
gaccaccacc tacggccccg gttacaccaa cgccctgaag gccctcgccg aggcgggtcca 5880  
ggcgagatc cccgtggtgc tcgtcaccgg ggacgccccg agcagcgggc cccggccttg 5940  
ggacgtggac caggccgca tcgccgcgg gctgggggcg gcgaccttca cggtcacccg 6000  
tgaagccgca ggctccatca cgcaggaagc ggtggagtac gcaattgccc ggcggaccgc 6060  
cgtcgtgatc gccgttccat acgacctgtc ggcccttgag gcggcgagg aagatcttcc 6120  
cgtgccgccc gcggcctcgg ttccggacgc catcggcggc ggactcggac gggcgccga 6180  
agtgcgggcg gccgaattgc tggcgggcgc gaagcgggcc ctcattccttg ccggccgcgg 6240

tgcgacacctc gcaggaaccg gccccgaact ccgggaactc gccgaccgcc tcggcgcgct 6300  
cacggccggc accgcactgg cgctgaacct gctgcagggc gaggggtacc tcggcgtcgc 6360  
ggggcgcttc ggcacggata ccggcgccgg gctcatgggc gagggggacg tgggtgctcgt 6420  
ggcgggagcc agcctgaccc ccttcaccat gcgcttcggc cacctgatcg gcccgacgc 6480  
caccgtgatc cagatcgaca ccgccatgga gccgacggac ccgggggtgg acctgtttgt 6540  
cagtgcggac gcgaaggccg ctgccggccg gatcctccgg ctgctggatg acgccgccgg 6600  
ggccaatgcg tcgaaggcct ggcgcgcgga agcactcaag cgtctggccg aaggaccctg 6660  
ccaccacccc ggcaccgcag agaccacgga cggccgcctt gacccccggg cgcttgcttc 6720  
ggcactggat gccgtcctgc cggaacgcc caccgtggtc caggacggcg ggcacttcct 6780  
gggctgggca cccatgtact ggcgcatccc ccgtcctcag gacctggtca tgggtggggac 6840  
cgctaccag tcgatcgggc ttggcctggc cagcgccgtg gggcgctccc gggcggtgga 6900  
cgacggcaat atcctggtgc tggcgccggg cgacggcgga ttcctgatgg gcctgtccga 6960  
cctggaatcg ctctggggc cggcgagcag cggcgctcgt gtgatctaca acgacgcgc 7020  
ctacggggcc gagatccatc agtacggctc acgggggctc accgaaaagc ccctgctgat 7080  
ccccgaagtg gacttcagcg ggattgcccg cgcgatcggg gcggaatccg caatcatccg 7140  
caagctgtcg gacctctccg cgctcacgga ctggatcgag gccggcgcca ggggaacctt 7200  
cgtggccgac tgccgcatca cctcaagcgt ccggggccccg tggctgagcg aatggatgag 7260  
ggcctcgcaa gggcggaagg aggcgggtggc gggctagggc cggcctcgtc gaaatgccgc 7320  
cctccaaccc aactcagtac cagctcaggg cgttctcagg gctgggaacg ccctgagctg 7380  
ctactcattt gttcgaactc gaggtcgacg gtatcgataa gcttgatata gaattcctgc 7440  
agccccgggg atccactagg ggatcccccg atccgcgttt gtgttttctg ggtttctcac 7500  
ttaagcgtct gcgttttact tttgtattgg gtttggcgtt tagtagtttg cggtagcgtt 7560  
cttgttatgt gtaattacgc tttttcttct tgcttcagca gtttcggttg aaatataaat 7620  
cgaatcaagt ttcactttat cagcgttggt taaattttg gcattaaatt ggtgaaaatt 7680  
gcttcaattt tgtatctaaa tagaagagac aacatgaaat tcgacttttg acctcaaata 7740  
ttcgaacatt tatttcctga tttcacgatg gatgaggata acgaaagggc ggttcctatg 7800  
tccgggaaag ttcccgtaga agacaatgag caaagctact gaaacgcgga cagcagctcg 7860  
cattggtacg gatatgagtt aaaccgactc aattccttta ttaagacata aaccgatttt 7920  
ggttaaagtg taacagtgag ctgatataaa accgaaacaa accggtacaa gtttgattga 7980  
gcaacttgat gacaaacttc agaattttgg ttattgaatg aaaatcatag tctaatacgt 8040  
aaaaatgtac agaagaaaag ctagagcaga acaagatctc tatattctgg ttccaattta 8100  
tcctcgcttt aacgtccctc agatttgatc gggctgcagg aattcggcct gactgatcat 8160  
ttaaacacta ggtcgggaat tgcggcc 8187



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
10 mai 2002 (10.05.2002)

PCT

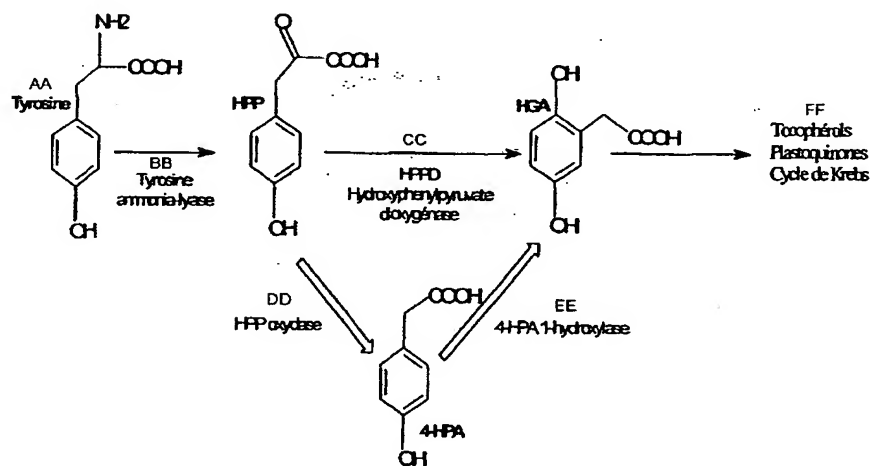
(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/036787 A3

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C12N 15/82, 9/02, 15/62, A01H 5/00
- (21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/03364
- (22) Date de dépôt international :  
30 octobre 2001 (30.10.2001)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :  
00/13942 30 octobre 2000 (30.10.2000) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : AVEN-  
TIS CROPS SCIENCE S.A. [FR/FR]; 55, avenue René  
Cassin, F-69009 Lyon (FR).
- (72) Inventeurs; et  
(73) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : ZINK,  
Olivier [FR/FR]; 1, place du Sausage, F-63000 Cler-  
mont-Ferrand (FR). PAGET, Eric [FR/FR]; 123, avenue  
du Général de Gaulle, F-69300 Caluire (FR). ROL-  
LAND, Anne [FR/FR]; 41, rue Louis Bouquet, F-69009  
Lyon (FR). SAILLAND, Alain [FR/FR]; 47 chemin  
de Crécy, F-63370 Saint-Didier-au-Mont-d'Or (FR).  
FREYSSINET, Georges [FR/FR]; 21, rue de Nervieux,  
F-69450 Saint-Cyr-au-Mont-d'Or (FR).
- (74) Mandataire : MONCONDUIT, Hervé; Aventis Crop-  
Science S.A., 14-20, rue Pierre Baizet, B.P. 9163, F-69263  
Lyon Cedex 09 (FR).
- (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: HERBICIDE-TOLERANT PLANTS THROUGH BYPASSING METABOLIC PATHWAY

(54) Titre : PLANTES TOLERANTES AUX HERBICIDES PAR CONTOURNEMENT DE VOIE METABOLIQUE



AA...TYROSINE  
BB...TYROSINE AMMONIA-LYASE  
CC...HYDROXYPHENYLPYRUVATE DOXYGENASE  
DD...HPP OXYDASE  
EE...4-HPA 1-HYDROXYLASE  
FF...TOCOPHEROLS  
PLASTOQUINONES  
KLEBS CYCLE

(57) Abstract: The invention concerns a novel method for making herbicide-tolerant plants, in particular to HPPD inhibiting herbicides, the nucleic acid sequences coding for enzymes capable of being used in said method, expression cassettes containing them and transgenic plants comprising at least one of said expression cassettes.

[Suite sur la page suivante]



LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclarations en vertu de la règle 4.17 :**

- relative au droit du déposant de demander et d'obtenir un brevet (règle 4.17.ii) pour les désignations suivantes AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE,

SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv) pour US seulement

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale

- (88) Date de publication du rapport de recherche internationale:

29 août 2002

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une nouvelle méthode permettant de rendre les plantes tolérantes aux herbicides, en particulier aux herbicides inhibiteurs d'HPPD, les séquences d'acides nucléiques codant pour des enzymes susceptibles d'être employées dans cette méthode, les cassettes d'expression les contenant et les plantes transgéniques comprenant au moins l'une de ces cassettes d'expression.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/03364

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12N9/02 C12N15/62 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                   | Relevant to claim No. |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A          | WO 96 38567 A (MATRINGE MICHEL ;ROLLAND ANNE (FR); SAILLAND ALAIN (FR); RHONE POU)<br>5 December 1996 (1996-12-05)<br>cited in the application<br>the whole document | 1-3                   |
| A          | WO 99 24585 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE)<br>20 May 1999 (1999-05-20)<br>cited in the application<br>the whole document                                               | 1-3                   |
| A          | WO 99 53081 A (BRYAN IAN BENNETT ;SHIPTON CATHERINE ANN (GB); ZENECA LTD (GB))<br>21 October 1999 (1999-10-21)<br>cited in the application<br>the whole document     | 1-3                   |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 May 2002

Date of mailing of the international search report

14/05/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/03364

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No.       |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| X          | WO 99 34008 A (DEROSE RICHARD ; SAILLAND ALAIN (FR); RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR))<br>8 July 1999 (1999-07-08)<br>cited in the application                                                                                                                                                         | 4-14                        |
| Y          | the whole document                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 15-20                       |
| Y          | EP 0 343 100 A (SCHERING AG).<br>23 November 1989 (1989-11-23)<br>the whole document                                                                                                                                                                                                                | 15-20                       |
| X          | PRIETO M A ET AL: "Molecular characterization of the 4-hydrophenylacetate catabolic pathway of Escherichia coli W: Engineering a mobile aromatic degradative cluster."<br>JOURNAL OF BACTERIOLOGY,<br>vol. 178, no. 1, 1996, pages 111-120,<br>XP002172217<br>ISSN: 0021-9193<br>the whole document | 8,10,11,<br>13-15,<br>17-20 |
| X          | EP 0 633 317 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE)<br>11 January 1995 (1995-01-11)<br>claim 4; example 1                                                                                                                                                                                                     | 16,19,20                    |
| X          | WO 98 21348 A (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) 22 May 1998 (1998-05-22)<br>page 26; claims 1,2,17,21-24                                                                                                                                                                                                | 17,19-24                    |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/03364

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9638567                                | A | 05-12-1996          | FR 2734840 A1              | 06-12-1996          |
|                                           |   |                     | FR 2734841 A1              | 06-12-1996          |
|                                           |   |                     | FR 2734842 A1              | 06-12-1996          |
|                                           |   |                     | AU 718982 B2               | 04-05-2000          |
|                                           |   |                     | AU 6228696 A               | 18-12-1996          |
|                                           |   |                     | BG 102131 A                | 31-07-1998          |
|                                           |   |                     | BR 9608375 A               | 05-01-1999          |
|                                           |   |                     | CA 2219979 A1              | 05-12-1996          |
|                                           |   |                     | CN 1192243 A               | 02-09-1998          |
|                                           |   |                     | CZ 9703809 A3              | 18-03-1998          |
|                                           |   |                     | EP 0828837 A2              | 18-03-1998          |
|                                           |   |                     | WO 9638567 A2              | 05-12-1996          |
|                                           |   |                     | HR 960245 A1               | 31-08-1997          |
|                                           |   |                     | HU 9900450 A2              | 28-05-1999          |
|                                           |   |                     | JP 11505729 T              | 25-05-1999          |
|                                           |   |                     | NZ 311055 A                | 28-02-2000          |
|                                           |   |                     | PL 323679 A1               | 14-04-1998          |
|                                           |   |                     | SK 161597 A3               | 08-07-1998          |
|                                           |   |                     | TR 9701492 T1              | 21-02-1998          |
|                                           |   |                     | US 6268549 B1              | 31-07-2001          |
| WO 9924585                                | A | 20-05-1999          | FR 2770854 A1              | 14-05-1999          |
|                                           |   |                     | AU 1160399 A               | 31-05-1999          |
|                                           |   |                     | AU 738279 B2               | 13-09-2001          |
|                                           |   |                     | AU 1161499 A               | 31-05-1999          |
|                                           |   |                     | CA 2309318 A1              | 20-05-1999          |
|                                           |   |                     | CA 2309322 A1              | 20-05-1999          |
|                                           |   |                     | CN 1285875 T               | 28-02-2001          |
|                                           |   |                     | EP 1029059 A1              | 23-08-2000          |
|                                           |   |                     | EP 1029060 A1              | 23-08-2000          |
|                                           |   |                     | WO 9924585 A1              | 20-05-1999          |
|                                           |   |                     | WO 9924586 A1              | 20-05-1999          |
|                                           |   |                     | JP 2001522608 T            | 20-11-2001          |
|                                           |   |                     | US 6245968 B1              | 12-06-2001          |
|                                           |   |                     | ZA 9810076 A               | 07-05-1999          |
| WO 9953081                                | A | 21-10-1999          | AU 3429899 A               | 01-11-1999          |
|                                           |   |                     | BR 9909501 A               | 12-12-2000          |
|                                           |   |                     | CA 2321965 A1              | 21-10-1999          |
|                                           |   |                     | CN 1296526 T               | 23-05-2001          |
|                                           |   |                     | EP 1078084 A1              | 28-02-2001          |
|                                           |   |                     | WO 9953081 A1              | 21-10-1999          |
| WO 9934008                                | A | 08-07-1999          | FR 2772789 A1              | 25-06-1999          |
|                                           |   |                     | AU 740209 B2               | 01-11-2001          |
|                                           |   |                     | AU 1880899 A               | 19-07-1999          |
|                                           |   |                     | CA 2315903 A1              | 08-07-1999          |
|                                           |   |                     | EP 1042496 A1              | 11-10-2000          |
|                                           |   |                     | WO 9934008 A1              | 08-07-1999          |
| EP 0343100                                | A | 23-11-1989          | DE 3817384 A1              | 30-11-1989          |
|                                           |   |                     | AT 108202 T                | 15-07-1994          |
|                                           |   |                     | CA 1338440 A1              | 09-07-1996          |
|                                           |   |                     | DE 58907998 D1             | 18-08-1994          |
|                                           |   |                     | DK 231289 A                | 20-11-1989          |
|                                           |   |                     | EP 0343100 A2              | 23-11-1989          |
|                                           |   |                     | ES 2059815 T3              | 16-11-1994          |
|                                           |   |                     | IE 67527 B1                | 03-04-1996          |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/03364

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0343100                                | A                   | JP 2128689 A               | 17-05-1990          |
|                                           |                     | JP 2801263 B2              | 21-09-1998          |
|                                           |                     | US 5543306 A               | 06-08-1996          |
|                                           |                     | US 5846803 A               | 08-12-1998          |
|                                           |                     | US 5948670 A               | 07-09-1999          |
|                                           |                     | US 5347076 A               | 13-09-1994          |
|                                           |                     | US 6060645 A               | 09-05-2000          |
| EP 0633317                                | A 11-01-1995        | FR 2706909 A1              | 30-12-1994          |
|                                           |                     | AU 680899 B2               | 14-08-1997          |
|                                           |                     | AU 6594794 A               | 05-01-1995          |
|                                           |                     | BR 9401842 A               | 17-01-1995          |
|                                           |                     | CA 2126806 A1              | 26-12-1994          |
|                                           |                     | EP 0633317 A1              | 11-01-1995          |
|                                           |                     | JP 7008278 A               | 13-01-1995          |
|                                           |                     | US 6313282 B1              | 06-11-2001          |
|                                           |                     | ZA 9404508 A               | 12-04-1995          |
| WO 9821348                                | A 22-05-1998        | WO 9821348 A1              | 22-05-1998          |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 01/03364

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 C12N15/82 C12N9/02 C12N15/62 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                       | no. des revendications visées |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| A           | WO 96 38567 A (MATRINGE MICHEL ; ROLLAND ANNE (FR); SAILLAND ALAIN (FR); RHONE POU)<br>5 décembre 1996 (1996-12-05)<br>cité dans la demande<br>le document en entier | 1-3                           |
| A           | WO 99 24585 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE)<br>20 mai 1999 (1999-05-20)<br>cité dans la demande<br>le document en entier                                                | 1-3                           |
| A           | WO 99 53081 A (BRYAN IAN BENNETT ; SHIPTON CATHERINE ANN (GB); ZENECA LTD (GB))<br>21 octobre 1999 (1999-10-21)<br>cité dans la demande<br>le document en entier     | 1-3                           |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 mai 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/05/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Oderwald, H

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Donnée internationale No

PCT/FR 01/03364

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                                                                                         | no. des revendications visées |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| X         | WO 99 34008 A (DEROSE RICHARD ; SAILLAND ALAIN (FR); RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR))<br>8 juillet 1999 (1999-07-08)<br>cité dans la demande                                                                                                                                                             | 4-14                          |
| Y         | le document en entier                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 15-20                         |
| Y         | EP 0 343 100 A (SCHERING AG)<br>23 novembre 1989 (1989-11-23)<br>le document en entier                                                                                                                                                                                                                 | 15-20                         |
| X         | PRIETO M A ET AL: "Molecular characterization of the 4-hydrophenylacetate catabolic pathway of Escherichia coli W: Engineering a mobile aromatic degradative cluster."<br>JOURNAL OF BACTERIOLOGY,<br>vol. 178, no. 1, 1996, pages 111-120,<br>XP002172217<br>ISSN: 0021-9193<br>le document en entier | 8, 10, 11,<br>13-15,<br>17-20 |
| X         | EP 0 633 317 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE)<br>11 janvier 1995 (1995-01-11)<br>revendication 4; exemple 1                                                                                                                                                                                                | 16, 19, 20                    |
| X         | WO 98 21348 A (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) 22 mai 1998 (1998-05-22)<br>page 26; revendications 1, 2, 17, 21-24                                                                                                                                                                                        | 17, 19-24                     |

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Donnée Internationale No

PCT/FR 01/03364

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche |   | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|-------------------------------------------------|---|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| WO 9638567                                      | A | 05-12-1996             | FR 2734840 A1                           | 06-12-1996             |
|                                                 |   |                        | FR 2734841 A1                           | 06-12-1996             |
|                                                 |   |                        | FR 2734842 A1                           | 06-12-1996             |
|                                                 |   |                        | AU 718982 B2                            | 04-05-2000             |
|                                                 |   |                        | AU 6228696 A                            | 18-12-1996             |
|                                                 |   |                        | BG 102131 A                             | 31-07-1998             |
|                                                 |   |                        | BR 9608375 A                            | 05-01-1999             |
|                                                 |   |                        | CA 2219979 A1                           | 05-12-1996             |
|                                                 |   |                        | CN 1192243 A                            | 02-09-1998             |
|                                                 |   |                        | CZ 9703809 A3                           | 18-03-1998             |
|                                                 |   |                        | EP 0828837 A2                           | 18-03-1998             |
|                                                 |   |                        | WO 9638567 A2                           | 05-12-1996             |
|                                                 |   |                        | HR 960245 A1                            | 31-08-1997             |
|                                                 |   |                        | HU 9900450 A2                           | 28-05-1999             |
|                                                 |   |                        | JP 11505729 T                           | 25-05-1999             |
|                                                 |   |                        | NZ 311055 A                             | 28-02-2000             |
|                                                 |   |                        | PL 323679 A1                            | 14-04-1998             |
|                                                 |   |                        | SK 161597 A3                            | 08-07-1998             |
|                                                 |   |                        | TR 9701492 T1                           | 21-02-1998             |
|                                                 |   |                        | US 6268549 B1                           | 31-07-2001             |
| WO 9924585                                      | A | 20-05-1999             | FR 2770854 A1                           | 14-05-1999             |
|                                                 |   |                        | AU 1160399 A                            | 31-05-1999             |
|                                                 |   |                        | AU 738279 B2                            | 13-09-2001             |
|                                                 |   |                        | AU 1161499 A                            | 31-05-1999             |
|                                                 |   |                        | CA 2309318 A1                           | 20-05-1999             |
|                                                 |   |                        | CA 2309322 A1                           | 20-05-1999             |
|                                                 |   |                        | CN 1285875 T                            | 28-02-2001             |
|                                                 |   |                        | EP 1029059 A1                           | 23-08-2000             |
|                                                 |   |                        | EP 1029060 A1                           | 23-08-2000             |
|                                                 |   |                        | WO 9924585 A1                           | 20-05-1999             |
|                                                 |   |                        | WO 9924586 A1                           | 20-05-1999             |
|                                                 |   |                        | JP 2001522608 T                         | 20-11-2001             |
|                                                 |   |                        | US 6245968 B1                           | 12-06-2001             |
|                                                 |   |                        | ZA 9810076 A                            | 07-05-1999             |
| WO 9953081                                      | A | 21-10-1999             | AU 3429899 A                            | 01-11-1999             |
|                                                 |   |                        | BR 9909501 A                            | 12-12-2000             |
|                                                 |   |                        | CA 2321965 A1                           | 21-10-1999             |
|                                                 |   |                        | CN 1296526 T                            | 23-05-2001             |
|                                                 |   |                        | EP 1078084 A1                           | 28-02-2001             |
|                                                 |   |                        | WO 9953081 A1                           | 21-10-1999             |
| WO 9934008                                      | A | 08-07-1999             | FR 2772789 A1                           | 25-06-1999             |
|                                                 |   |                        | AU 740209 B2                            | 01-11-2001             |
|                                                 |   |                        | AU 1880899 A                            | 19-07-1999             |
|                                                 |   |                        | CA 2315903 A1                           | 08-07-1999             |
|                                                 |   |                        | EP 1042496 A1                           | 11-10-2000             |
|                                                 |   |                        | WO 9934008 A1                           | 08-07-1999             |
| EP 0343100                                      | A | 23-11-1989             | DE 3817384 A1                           | 30-11-1989             |
|                                                 |   |                        | AT 108202 T                             | 15-07-1994             |
|                                                 |   |                        | CA 1338440 A1                           | 09-07-1996             |
|                                                 |   |                        | DE 58907998 D1                          | 18-08-1994             |
|                                                 |   |                        | DK 231289 A                             | 20-11-1989             |
|                                                 |   |                        | EP 0343100 A2                           | 23-11-1989             |
|                                                 |   |                        | ES 2059815 T3                           | 16-11-1994             |
|                                                 |   |                        | IE 67527 B1                             | 03-04-1996             |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 01/03364

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche |   | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|-------------------------------------------------|---|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| EP 0343100                                      | A |                        | JP 2128689 A                            | 17-05-1990             |
|                                                 |   |                        | JP 2801263 B2                           | 21-09-1998             |
|                                                 |   |                        | US 5543306 A                            | 06-08-1996             |
|                                                 |   |                        | US 5846803 A                            | 08-12-1998             |
|                                                 |   |                        | US 5948670 A                            | 07-09-1999             |
|                                                 |   |                        | US 5347076 A                            | 13-09-1994             |
|                                                 |   |                        | US 6060645 A                            | 09-05-2000             |
| EP 0633317                                      | A | 11-01-1995             | FR 2706909 A1                           | 30-12-1994             |
|                                                 |   |                        | AU 680899 B2                            | 14-08-1997             |
|                                                 |   |                        | AU 6594794 A                            | 05-01-1995             |
|                                                 |   |                        | BR 9401842 A                            | 17-01-1995             |
|                                                 |   |                        | CA 2126806 A1                           | 26-12-1994             |
|                                                 |   |                        | EP 0633317 A1                           | 11-01-1995             |
|                                                 |   |                        | JP 7008278 A                            | 13-01-1995             |
|                                                 |   |                        | US 6313282 B1                           | 06-11-2001             |
|                                                 |   |                        | ZA 9404508 A                            | 12-04-1995             |
| WO 9821348                                      | A | 22-05-1998             | WO 9821348 A1                           | 22-05-1998             |